



**Ana Ellen Octávio Marques**  
Licenciatura em Engenharia do Ambiente

## **Avaliação da influência do ferro e alumínio sobre o crescimento e produção de toxinas por cianobactérias em cultura mista**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do  
Ambiente, perfil Engenharia Sanitária

Orientadora: Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos  
Santos, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Profª Doutora Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos Santos  
Arguente: Prof. Doutor António Manuel Fernandes Rodrigues  
Vogal: Profª Doutora Isabel Maria Lopes Pereira Carlos Peres





**Ana Ellen Octávio Marques**  
Licenciatura em Engenharia do Ambiente

## **Avaliação da influência do ferro e alumínio sobre o crescimento e produção de toxinas por cianobactérias em cultura mista**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do  
Ambiente, perfil Engenharia Sanitária

Orientadora: Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos  
Santos, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Profª Doutora Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos Santos  
Arguente: Prof. Doutor António Manuel Fernandes Rodrigues  
Vogal: Profª Doutora Isabel Maria Lopes Pereira Carlos Peres



**Copyright**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e encorajamento que fui recebendo ao longo deste período. A todos deixo o meu agradecimento.

À Professora Doutora Maria da Conceição Raimundo dos Santos, pelo privilégio de me ter aceite como sua orientanda, pelo acompanhamento e disponibilidade, assim como todas as sugestões feitas para a melhoria deste trabalho. Aqui expresso o meu sincero agradecimento.

À Engenheira Helena Muelle, pelo apoio imprescindível e ensinamentos na área de análise e quantificação de microcistinas. Por todas as sugestões, comentários, críticas e incentivos.

Às técnicas do laboratório, D. Luísa e D. Adélia, pelo apoio e disponibilidade na realização dos trabalhos experimentais.

Ao Bruno, Busto e sua equipa, sem o seu bom humor, os dias de desânimo seriam mais difíceis de suportar.

Finalmente, um agradecimento aos meus amigos e família, em especial SMA, MKA, tia e mãe, pelo apoio incondicional e confiança depositada. A eles, dedico todo este trabalho.





## Sumário

Na presente dissertação foram investigados os efeitos de dois metais, ferro e alumínio, sobre o crescimento e produção de toxinas por cianobactérias, em culturas mistas, ricas em *Microcystis aeruginosa*. Florescências tóxicas desta cianobactéria são conhecidas por ocorrer em lagos, albufeiras e rios por todo o mundo. As microcistinas, toxinas produzidas por esta espécie, são as mais comumente detectadas, e já mostraram ser tóxicas para mamíferos, peixes e invertebrados.

O ferro é bem conhecido por ser um metal essencial ao metabolismo de cianobactérias, e ao alumínio, não lhe é atribuído nenhuma função biológica.

A amostra foi recolhida na lagoa das Furnas (Açores). Foram testadas quatro doses de ferro (0, 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ) e quatro doses de alumínio (0, 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ). O crescimento foi monitorizado pela produção de biomassa, avaliado pelo conteúdo de clorofila *a* e carbono orgânico particulado.

No ensaio com o ferro o crescimento da biomassa e produção de toxinas intracelulares foram favorecidos pelo aumento da concentração de ferro. A cultura com a maior dose de ferro testada (30  $\mu\text{M}$ ) foi a que apresentou maior crescimento ao longo do período experimental e maior concentração de toxinas intracelulares no final do mesmo. A cultura sem adição de ferro foi a que apresentou menores concentrações dos parâmetros avaliados. Ficou demonstrada a influência deste metal no crescimento, na produção de pigmentos e de toxinas pelas cianobactérias.

No ensaio com o alumínio, houve um aumento de biomassa nas culturas, mas este nunca foi superior à cultura sem adição de alumínio. A produção de toxinas intracelulares foi decrescente com o aumento da concentração de alumínio nas culturas, e a produção de toxinas extracelulares foi crescente. Desta forma, foi possível constatar que o alumínio inibiu a produção de biomassa e de toxinas intracelulares e promoveu a libertação das mesmas.

A realização de trabalhos experimentais com seres vivos resulta nalguma variabilidade e imprevisibilidade dos resultados. O facto de se ter realizado apenas uma réplica para cada ensaio constitui limitações a este trabalho.

**Palavras-Chave:** Cianobactérias; Cianotoxinas; Microcistinas; Ferro; Alumínio.



## **Abstract**

In this thesis we investigated the effects of two metals, iron and aluminium, on growth and toxin production by cyanobacteria in mixed cultures, rich in *Microcystis aeruginosa*. Toxic blooms of cyanobacteria are known to occur in lakes, reservoirs and rivers all over the world. The microcystins, toxins produced by this specie, are the most commonly detected and have shown to be toxic to mammals, fish and invertebrates.

Iron is well known to be an essential metal for the metabolism of cyanobacteria, and aluminium is a metal lacking biological function.

The sample was collected in the lagoon of Furnas (Azores). Four levels of iron (0, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ ) and four levels of aluminium (0, 2, 4 and 8  $\mu\text{M}$ ) were tested. The growth was monitored by the production of biomass, measured by chlorophyll *a* and particulate organic carbon content.

In the test with iron, biomass growth and production of intracellular toxins were favored by increasing the concentration of iron. The culture with the higher level of iron tested (30  $\mu\text{M}$ ) showed the largest growth over the experimental period and higher intracellular concentration of toxins in the end. The culture without added iron showed the lowest concentrations of these parameters. The influence of this nutrient on growth, pigment and toxins production by cyanobacteria was demonstrated.

In the test with the aluminium, an increase of biomass was registered, but this was never higher than the culture without addition of aluminium. The production of intracellular toxin was decreasing with increasing concentration of aluminum in the cultures, and production of extracellular toxins was growing. Thus, it was established that aluminum inhibited the production of biomass and intracellular toxins and promoted the release of same.

The experimental work with animals results in some variability and unpredictability of results. The fact that we have done only one reply for each test creates a limitation to this work.

**Keywords:** Cyanobacteria; Cyanotoxins; Microcystin; Iron, Aluminum.



## Simbologia

ATP	Adenosina trifosfato
Cl <sub>a</sub>	Clorofila <i>a</i>
COP	Carbono orgânico particulado
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
L	Litro
LD <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população em teste
LPS	Lipopolissacarídeos
MC – LR	Microcistina leucina (L) Arginina (R)
MC – LA	Microcistina Leucina (L) Alanina (A)
MC – RR	Microcistina Arginina (R) Arginina (R)
MC – YR	Microcistina Triptofano (Y) Arginina (R)
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ <i>World Health Organization</i>
PDA	<i>Photo Diode Array</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PP1	<i>Protein Ser/Thr Phosphatase type 1</i> (fosfatase proteica de serina/treonina do tipo 1)
PP2A	<i>Protein Ser/Thr Phosphatase type 2A</i> (fosfatase proteica de serina/treonina do tipo 2A)
PSP	<i>Paralytic Shelfish Poisons</i>
rpm	Rotações por minuto
SPE	<i>Solid Phase Extration</i>
SST	Sólidos suspensos totais
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
µg	Micrograma



## Índice

1	Introdução .....	1
1.1	Cianobactérias e sua ocorrência em meios naturais .....	1
1.2	Cianotoxinas.....	6
1.2.1	Neurotoxinas .....	8
1.2.2	Hepatotoxinas.....	11
1.2.3	Dermatotoxinas.....	16
1.3	Riscos de ocorrência de cianobactérias e de cianotoxinas.....	17
1.3.1	Organismos aquáticos .....	17
1.3.2	Mamíferos .....	19
1.3.3	Humanos.....	20
1.4	Ocorrência de cianobactérias e suas toxinas em Portugal.....	21
1.5	Legislação e Regulamentação .....	22
1.6	Influência de metais (Fe e Al) sobre a produção de toxinas intracelulares.....	24
2	Objectivo .....	27
3	Metodologia .....	29
3.1	Plano de trabalho.....	29
3.2	Ensaaios .....	29
3.3	Metodologia analítica .....	30
3.3.1	pH.....	30
3.3.2	Sólidos Suspensos Totais (SST) .....	30
3.3.3	Clorofila <i>a</i> .....	30
3.3.4	Carbono Orgânico Particulado (COP) .....	31
3.3.5	Toxinas.....	32
4	Resultados e discussão.....	35
4.1	pH.....	35
4.2	SST.....	35
4.3	Clorofila <i>a</i> .....	36
4.4	Carbono Orgânico Particulado.....	38
4.5	Toxinas .....	39
4.6	Concentração de toxinas por unidade de biomassa (MC-LR:Cl <sub>a</sub> e MC-LR:COP) .....	41
5	Conclusão .....	43
6	Bibliografia .....	45

7 Anexo ..... 51



## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura química da Anatoxina-a (Briand <i>et al.</i> , 2003).....	9
Figura 1.2 - Estrutura química da Homoanatoxina-a (Briand <i>et al.</i> , 2003) .....	9
Figura 1.3 - Estrutura química da Anatoxina-a(s) (Briand <i>et al.</i> , 2003).....	10
Figura 1.4 - Estrutura química geral das Saxitoxinas (Carmichael, 1992) .....	11
Figura 1.5 - Estrutura química das microcistinas mais comuns (Duy <i>et al.</i> , 2000).....	14
Figura 1.6 - Estrutura química da nodularina (Duy <i>et al.</i> , 2000) .....	15
Figura 1.7 - Estrutura química da Cilindrospermopsina (Funari <i>et al.</i> , 2008) .....	16
Figura 1.8 - Estrutura química da Lingbiatoxina-a (A) e da LPS (B) (Briand <i>et al.</i> , 2003) .....	17
Figura 3.1 - Montagem da extracção de toxinas da fase solúvel .....	33
Figura 3.2- Análise de toxinas por HPLC.....	34
Figura 4.1 - Concentração de SST (mg/L) no final do ensaio com o ferro.....	35
Figura 4.2 - Concentração de SST (mg/L) no final do ensaio com o alumínio.....	36
Figura 4.3 - Concentração de clorofila no ensaio com o ferro .....	37
Figura 4.4 - Concentração de clorofila <i>a</i> no ensaio com o alumínio .....	37
Figura 4.5 - Concentração de C.O.P (mg/m <sup>3</sup> ) no ensaio com o ferro.....	38
Figura 4.6- Concentração de C.O.P (mg/m <sup>3</sup> ) no ensaio com o alumínio.....	39
Figura 4.7- Concentração de toxinas no ensaio com o ferro .....	40
Figura 4.8 - Concentração de toxinas no ensaio com o alumínio .....	41
Figura 4.9 - Relação MC-LR: Cla e MC-LR: COP para o ensaio com ferro .....	41
Figura 4.10 - Relação MC-LR: Cla e MC-LR: COP para o ensaio com alumínio .....	42



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Características gerais distintivas entre as principais ordens de cianobactérias e entre alguns géneros de cianobactérias (Figueiredo <i>et al.</i> , 2007).....	3
Tabela 1.2 - Géneros de cianobactérias que possuem vesículas gasosas (Adaptado: Whitton & Potts, 2000).....	5
Tabela 1.3 - Espécies produtoras de toxinas (Adaptado: Dow & Swoboda, 2000).....	7
Tabela 1.4 - Toxicidade de cianotoxinas em mamíferos (Adaptado: Haider <i>et al.</i> , 2003).....	19
Tabela 1.5 - Casos de toxicidade humana associada à exposição de cianobactérias (Adaptado: WHO, 2003) .....	20
Tabela 1.6 - Valores limite de cianotoxinas em água para consumo humano .....	23
Tabela 1.7 - Valores de orientação para águas de recreio (Adaptado: WHO, 2003).....	24
Tabela 3.1 - Volumes de reagentes utilizados na determinação do COP .....	31
Tabela 7.1 - Composição do meio de cultura BG11 (Rippka <i>et al.</i> , 1979).....	51
Tabela 7.2 - Composição da solução de metais traço .....	51



## 1 Introdução

### 1.1 Cianobactérias e sua ocorrência em meios naturais

As cianobactérias compreendem um vasto e heterogêneo grupo de organismos fotossintéticos, que costumavam ser referidos como algas azuis-verdes. Devido à sua natureza procariótica, estes organismos são chamados de cianobactérias para evidenciar que não são organismos eucarióticos fotossintéticos (Brock & Madigan, 1991).

Estes organismos têm uma larga história evolutiva, uma vez que a maioria dos geólogos e geoquímicos estão de acordo que a sua existência data de há cerca de 3,5 mil milhões de anos (Ramírez *et al.*, 2004). Schopf & Walter (1882), citados em Whitton & Potts (2000), denominaram a Era Proterozoica (2500 – 570 Ma) como a Era das cianobactérias, porque é desta altura que é mais abundante o registo fóssil destes organismos.

As cianobactérias possuem uma grande flexibilidade a adaptações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e reprodutivas, o que garantiu a estes organismos a sua perpetuação na superfície terrestre e distribuição em diversos ambientes terrestres, aquáticos e interface húmida da terra com o ar (Brandão & Domingos, 2006).

Tal como as outras bactérias, não têm núcleo diferenciado nem um sistema de membranas. A parede celular, desprovida de celulose, é similar à das bactérias Gram-negativas, geralmente composta por polissacarídeos e polipeptídeos (Brock & Madigan, 1991; Tomaselli, 2004). Possuem um sistema fotossintético semelhante ao das algas (fotossistema 1 e 2), embora não organizado em cloroplastos. Possuem também pigmentos fotossintéticos, clorofila *a* e ficobilinas, não organizados em plastídeos.

As cianobactérias apresentam uma grande diversidade morfológica. Dependendo das espécies, podem apresentar formas unicelulares, coloniais ou filamentosas. As espécies unicelulares podem ser livres ou fixas. Nenhuma destas formas apresenta cílios, flagelos ou qualquer outro tipo de estrutura de locomoção, no entanto, esta pode ocorrer por deslizamento ou rotação (Tomaselli, 2004).

Quando as células estão agrupadas em filamentos, estes podem ou não possuir ramificações e ser ou não portadores de células especializadas, os heterocistos (Campinas *et al.*, 2002). As ramificações podem ser falsas (surgem normalmente adjacentes a uma célula morta ou especializada) ou verdadeiras (crescem por divisão contínua de uma célula em ângulos rectos relativamente ao eixo do filamento principal) (Whitton & Potts, 2000).

Uma característica importante nas cianobactérias, é que nestas ocorrem estruturas em forma de pequenos cilindros ocos, com extremidades cónicas permeáveis a gases mas não a água, chamadas vesículas gasosas. Estas vesículas, envolvidas por uma camada proteica, permitem às células controlar a profundidade de flutuação de acordo com a intensidade da luz, o teor em oxigénio e a concentração de nutrientes (Lopes & Fonseca, 1996). Uma vez que as vesículas gasosas são estruturas muito pequenas, são necessárias muitas para um organismo possuir a capacidade de flutuação e, estimativas apontam para a existência de cerca de 10 000 vesículas por célula. Estas vesículas não se encontram aleatoriamente dispersas no citoplasma, mas sim agrupadas em vacúolos para ocupar o mínimo espaço e proporcionar uma máxima flutuabilidade (Oliver & Ganf, 2000).

A reprodução é essencialmente assexuada, ocorrendo através de fissão binária das formas solitárias, de hormogónios (fragmentos de filamentos) ou de esporos (como acinetos e exósporos) (Figueiredo *et al.*, 2007). Embora não haja evidências de reprodução sexual, pode ocorrer recombinação genética por transformação ou conjugação (Tomaselli, 2004).

Apesar das características morfológicas continuarem a ser as mais utilizadas para distinguir as cianobactérias, na última década têm vindo a ser desenvolvidos projectos de organização dos taxa segundo estudos moleculares de filogenia. De acordo com a filogenia moderna, as cianobactérias são geralmente divididas em quatro ordens principais: *chroococcales*, *oscillatoriales*, *nostocales* e *stigonematales*, sistematizadas na tabela 1.1 (Figueiredo *et al.*, 2007).

**Tabela 1.1 - Características gerais distintivas entre as principais ordens de cianobactérias e entre alguns géneros de cianobactérias (Figueiredo *et al.*, 2007)**

Ordem	Características	Géneros	Características
Chroococcales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células solitárias ou em colónias mucilaginosas.</li> <li>• Reprodução geralmente por fissão binária ou exósporos.</li> </ul>	<i>Synechococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células solitárias ovais ou cilíndricas (+ compridas que largas) e sem bainha mucilaginosa.</li> </ul>
		<i>Synechocystis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células solitárias esféricas ou hemisféricas (após divisão) e sem bainha mucilaginosa.</li> </ul>
		<i>Chroococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células esféricas ou hemisféricas, com bainha mucilaginosa estratificada pouco espessa.</li> <li>• Solitárias ou em colónias esféricas (2, 4 ou 16 células), após divisão.</li> </ul>
		<i>Gloeocapsa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células esféricas ou ovais, com bainha mucilaginosa espessa e estratificada.</li> <li>• Colónias esféricas (de 4, 16, 32 ou mais células).</li> </ul>
		<i>Aphanothece</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células elipsóides, sem bainha mucilaginosa, distribuídas por todo o espaço da colónia numa matriz gelatinosa abundante e homogénea.</li> </ul>
		<i>Microcystis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células esféricas, sem bainha mucilaginosa e com muitas vesículas gasosas (escuras).</li> <li>• Colónias globosas (com subcolónias) de muitas células dentro de uma matriz gelatinosa.</li> </ul>
		<i>Merismopedia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células esféricas, com bainha mucilaginosa indistinta.</li> <li>• Colónia tabular, só com uma camada de células dispostas em linhas perpendiculares.</li> </ul>
		<i>Chamaesiphon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células ovais que crescem fixas a um substrato sólido (rochas ou algas).</li> <li>• Reprodução por exósporos, na parte terminal da célula.</li> </ul>
Oscillatoriales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filamentos não ramificados.</li> <li>• Sem células especializadas (heterocistos / acinetos).</li> <li>• Reprodução por hormogónios.</li> </ul>	<i>Oscillatoria</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricomas longos, sem bainha.</li> <li>• Células adjacentes, mais largas que compridas e semelhantes, excepto a célula apical.</li> </ul>
		<i>Lyngbya</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricomas semelhantes aos de <i>Oscillatoria</i>, mas com bainha rígida.</li> <li>• Só um tricoma dentro de cada bainha.</li> </ul>
		<i>Microcoleus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricomas semelhantes aos de <i>Oscillatoria</i>, mas reunidos (2 ou +) dentro de uma bainha mucilaginosa.</li> </ul>
		<i>Spirulina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricomas semelhantes ao de <i>Oscillatoria</i>, mas em espiral, e células sem septos visíveis.</li> </ul>
Nostocales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filamentos não ramificados ou com falsas ramificações.</li> <li>• Com heterocistos e acinetos.</li> <li>• Reprodução por hormogónios.</li> </ul>	<i>Nostoc</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células arredondadas, sem diferenciação das células terminais.</li> <li>• Heterocistos intercalares; acinetos presentes entre os heterocistos (mas não adjacentes).</li> <li>• Tricomas curvados, aglutinados numa mucilagem homogénea, firme e de forma definida.</li> </ul>

Tabela 1.1 – (Continuação)

Ordem	Características	Gêneros	Características
		<i>Anabaena</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células esféricas (semelhantes a <i>Nostoc</i>) ou cilíndricas, sem diferenciação das células terminais.</li> <li>• Heterocistos intercalares (+ ou - de 10 em 10 células vegetativas) e acinetos adjacentes.</li> <li>• Filamentos solitários e planctônicos, não unidos numa matriz gelatinosa.</li> </ul>
		<i>Aphanizomenon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricomas reunidos em feixes, não envolvidos numa mucilagem.</li> <li>• Células terminais geralmente alongadas e incolores, heterocistos intercalares.</li> </ul>
		<i>Nodularia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células discóides, sem diferenciação das células terminais; heterocistos intercalares.</li> <li>• Filamentos solitários ou agrupados num talo gelatinoso pouco consistente e de forma indefinida.</li> </ul>
		<i>Cylindrospermum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricoma com heterocisto terminal e normalmente com um grande acineto adjacente.</li> </ul>
		<i>Scytonema</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricoma com bainha mucilagínosa e com falsas ramificações (simples ou, mais frequentemente, duplas); heterocistos intercalares.</li> </ul>
		<i>Gloeotrichia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricoma fixo e atenuado num pêlo pluricelular hialino.</li> <li>• Com heterocisto basal e acineto adjacente.</li> <li>• Filamentos reunidos em colônias gelatinosas, esféricas ou hemisféricas.</li> </ul>
Stigonematales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filamentos com ramificações verdadeiras.</li> <li>• Com heterocistos e acinetos.</li> <li>• Reprodução por hormogônios.</li> </ul>	<i>Hapalosiphon</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eixo principal idêntico aos ramos laterais.</li> <li>• Filamentos cilíndricos, unisseriados (apenas com uma série de células), com ramificações verdadeiras unilaterais.</li> </ul>

As cianobactérias podem-se tornar num problema para diversos organismos aquáticos e terrestres quando, durante os meses mais quentes do ano (de Abril a Outubro nas zonas temperadas do hemisfério norte), o seu crescimento se torna excessivo num sistema aquático, formando enormes aglomerados celulares verdes (blooms ou florescências) que se acumulam à superfície da água em lagos, albufeiras e rios (Oliver & Ganf, 2000).

A ocorrência destas florescências variam em função das condições ambientais e das necessidades dos organismos, no entanto, florescências superficiais restringem-se a organismos que possuem mobilidade ou capacidade de flutuar, ou seja, espécies de cianobactérias que possuem vesículas gasosas. Estas encontram-se distribuídas pelos vários géneros descritos na tabela 1.2 (Oliver & Ganf, 2000).



**Tabela 1.2 - Géneros de cianobactérias que possuem vesículas gasosas (Adaptado: Whitton & Potts, 2000)**

<b>Géneros</b>	<b>Família</b>	<b>Ordem</b>
Anabaena	Nostocaceae	Nostocales
Anabaenopsis	Nostocaceae	
Aphanizomenon	Nostocaceae	
Nodularia	Nostocaceae	
Cylindrospermopsis	Nostocaceae	
Gleotrichia	Rivulariaceae	
Oscillatoria	Oscillatoriaceae	Oscillatoriales
Spirulina	Oscillatoriaceae	
Microcystis	Chroococcaceae	Chroococcales
Gomphosphaeria	Chroococcaceae	
Coelosphaerium	Chroococcaceae	

Com a estabilização da coluna de água, verificada nos meses mais quentes, cria-se um epilimnion com luz e um hipolimnion sem luz, resultando numa indisponibilidade dos nutrientes à superfície (pelo crescimento das algas à superfície e pela sedimentação dos nutrientes), problema que estas cianobactérias conseguem ultrapassar pela regulação da flutuação (Oliver & Ganf, 2000). Esta vantagem competitiva permite que uma espécie (ou uma associação de algumas espécies) de cianobactéria(s) se torne(m) dominante(s) em termos de densidade, relativamente às restantes espécies fitoplanctónicas presentes no sistema aquático (Figueiredo *et al.*, 2007).

Relatos de florescências de cianobactérias em água doce aumentaram em muitos países nos últimos anos, e os factores que levam à formação destas são hoje bem compreendidos (Whitton & Potts, 2000). Este fenómeno está geralmente associado à eutrofização dos sistemas aquáticos, excesso de nutrientes, que pode conduzir a um crescimento massivo de fitoplâncton, potenciada por actividades antropogénicas como a estabilização dos cursos de água (ex: construção de barragens, desvio dos cursos de água, extracção de água e drenagem), aumento das descargas de nutrientes (ex: efluentes provenientes da agropecuária, indústria, esgotos e águas residuais urbanas) e poluição difusa da lixiviação dos fertilizantes agrícolas e pesticidas (Codd, 2000, citado em Figueiredo *et al.*, 2007).

Diferentes factores ambientais favorecem o predomínio destes organismos, como temperaturas elevadas (18 a 25°C), condições de luz-energia (óptimas da Primavera ao

Outono em zonas temperadas), um pH neutro-alkalino (6,5-8,5), baixa taxa de filtração pelo zooplâncton (Ramírez *et al.*, 2004), e baixa turbulência (Figueiredo *et al.*, 2004).

Estas florescências de cianobactérias alteram o odor e sabor da água e resultam na perda do valor recreacional e de pesca dos meios aquáticos (Duy *et al.*, 2000).

## 1.2 Cianotoxinas

É conhecido que as cianobactérias produzem metabolitos secundários, com efeitos tóxicos para muitos organismos, incluindo humanos, conhecidos por cianotoxinas (Figueiredo *et al.*, 2004).

As cianotoxinas representam um grupo diversificado de toxinas naturais, do ponto de vista químico e toxicológico (Sivonen & Jones, 1999). Não parecem ter nenhum desempenho fundamental no funcionamento básico da célula (Wright & Cembela, 1998, citados em Landsberg, 2002), podendo a sua existência ter um carácter intrínseco (como por exemplo protecção contra os raios UV, armazenamento intracelular de nutrientes) ou extrínseco (como por exemplo ser tóxico para predadores, ser uma substância alelopática ou promover relações simbióticas). Apesar ocorrerem em meios aquáticos, grande parte destes compostos parecem ser menos tóxicos para a biota aquática do que para humanos e mamíferos terrestres (Sivonen & Jones, 1999).

As cianotoxinas são muito variadas na sua estrutura química e toxicidade (Figueiredo *et al.*, 2004). Estirpes tóxicas e não tóxicas já foram isolados de uma mesma florescência, mas há pouca informação sobre os factores que regulam esta expressão, ou seja, estirpes tóxicas poderem tornar-se não tóxicos e vice-versa. A toxicidade varia então, não só entre organismos de espécies diferentes, como também entre organismos da mesma espécie. Algumas espécies podem produzir três ou mais toxinas, sendo a proporção das mesmas influenciada por factores ambientais como luz, pH, azoto, fósforo, iões metálicos e temperatura (Carmichael *et al.*, 1992).

As espécies de cianobactérias reportadas como sendo tóxicas estão descritas na tabela 1.3 (Dow & Swoboda, 2000).

Tabela 1.3 - Espécies produtoras de toxinas (Adaptado: Dow &amp; Swoboda, 2000)

Espécies produtoras de toxinas	
<i>Anabaena circinalis</i>	<i>Microcystis botrys, viridis</i>
<i>A. Flos-aquae</i>	<i>Nodularia spumigena</i>
<i>A. hassallii</i>	<i>Nostoc linckia</i>
<i>A. lemermanni</i>	<i>N. paludosum</i>
<i>A. spiroides</i>	<i>N. rivulare</i>
<i>A. variabilis</i>	<i>N. zetterstedtii</i>
<i>Anabaenopsis milleri</i>	<i>Oscillatoria acutissima</i>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>O. agardhii/rubescens</i>
<i>Coelosphaerium kuetzingianum</i>	<i>O. formosa</i>
<i>Cylindrospermum sp.</i>	<i>O. nigroviridis</i>
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	<i>Oscillatoria sp.</i>
<i>Fischerella epiphytica</i>	<i>Pseudanabaena catenata</i>
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	<i>Schizothrix calcicola</i>
<i>Gomphosphaeria lacustris</i>	<i>Scytonema pseudohofmanni</i>
<i>G. naegliana</i>	<i>Synechococcus</i> strains (Miami BCII 6S & ATCC 18800)
<i>Hormothamnion enteromorphoides</i>	<i>Synechocystis sp.</i>
<i>Lyngbya majuscula</i>	<i>Tolypothrix byssoidea</i>
<i>Lyngbya wollei</i>	<i>Trichodesmium erythraeum</i>
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Umezakia natans</i>
<i>Microcystis wesenbergii</i>	

As cianotoxinas são compostos sintetizadas por um processo não- ribossomal que requer energia (ATP). As enzimas envolvidas neste processo (*peptídeo sintetase*), caracterizam-se por serem estruturas modulares em que cada módulo contém informação para a síntese de uma unidade péptídica (Haider *et al.*, 2003).

Estudos laboratoriais revelaram que apenas géneros tóxicos apresentam o gene da síntese destas enzimas. Então, a capacidade de um género de cianobactérias produzir toxinas depende principalmente da posse destes genes e da sua expressão em determinadas condições ambientais (Haider *et al.*, 2003).

Apesar de se desconhecer com exactidão as condições ambientais sob as quais as cianobactérias produzem toxinas (Haider *et al.*, 2003), e de existirem estudos contraditórios sobre o tema, alguns factores mostraram ter alguma influência na síntese de toxinas. Grande

parte dos estudos indica que as cianobactérias produzem a maioria das toxinas sob condições que são favoráveis ao seu crescimento, por exemplo, *Planktothrix* prefere baixas intensidades de luz para o crescimento, *Anabaena* moderadas e *Aphanizomenon* elevadas intensidades de luz.

Quimicamente, as cianotoxinas podem ser classificadas em três grupos: peptídeos cíclicos, alcaloídes e lipopolissacarídeos (Sivonen & Jones, 1999). De acordo com os seus efeitos em mamíferos, podem ser classificadas em dois grupos gerais (Dow & Swoboda, 2000):

- (a) Toxinas que causam envenenamento letal agudo – as neurotoxinas e as hepatotoxinas;
- (b) Toxinas que não são letais para os animais, mas que mostram bioactividade selectiva (irritações e lesões celulares) – as dermatotoxinas.

### 1.2.1 Neurotoxinas

Embora com diferentes mecanismos, todas as neurotoxinas conhecidas actuam sobre o sistema neuromuscular através do bloqueio esquelético e insuficiência respiratória (Funari & Testai, 2008).

São conhecidas três famílias de neurotoxinas:

- (a) anatoxina-a e homoanatoxina-a (imitam o efeito da acetilcolina);
- (b) anatoxina-a(s) (inibidor da acetilcolinesterase);
- (c) aphanotoxinas I e II, também conhecidas por Saxitoxinas e Neosaxitoxinas (actuam sobre as células nervosas e bloqueiam os canais de sódio) (Sivonen & Jones, 1999).

#### 1.2.1.1 Anatoxina-a

A anatoxina-a foi a primeira toxina de cianobactéria de água doce a ser química e funcionalmente definida (Carmichael *et al.*, 1992). É produzida por vários géneros de cianobactérias, *Anabaena* (*planctonica*, *flos-aquae*, *spiroides* e *circinalis*) *Oscillatoria* (*Planktothrix*) sp., *Cylindrospermum* sp. e *Aphanizomenon* sp. É produzida também em pequenas quantidades por *Microcystis* spp (no Japão) (Sivonen & Jones, 1999; Duy *et al.*, 2000).

Este composto, 2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno, é um alcaloíde que possui uma amina secundária bicíclica (figura 1.1), de massa molecular 165 Daltons (Teixeira & Rosa, 2006).

A anatoxina-a é estruturalmente análoga à acetilcolina, que é um neurotransmissor. Não sendo degradada pela acetilcolinesterase como a acetilcolina, ocorre uma excessiva estimulação do músculo até a sua paralisia (Dow & Swoboda, 2000).

Ensaio laboratoriais mostraram uma rápida decomposição desta toxina na presença de luz solar, particularmente com valores elevados de pH (Furey *et al.*, 2003 citado em Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

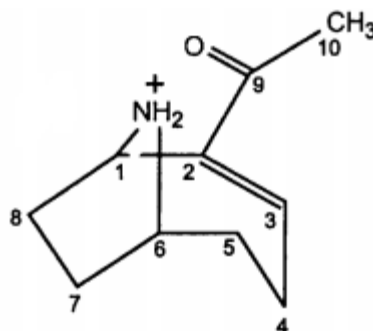


Figura 1.1 - Estrutura química da Anatoxina-a (Briand *et al.*, 2003)

#### 1.2.1.2 Homoanatoxina-a

Esta toxina foi reportada como sendo produzida por *Oscillatoria formosa* e é caracterizada por ser um alcalóide de amina secundária, metileno-anatoxin-a (figura 1.2), de peso molecular 179 Daltons.

Semelhante à anatoxin-a, a homoanatoxina-a actua como um bloqueador neuromuscular (Dow & Swoboda, 2000). Estudos laboratoriais sobre o efeito desta toxina na transmissão neuromuscular mostraram que esta tem como alvo a junção neuromuscular, actuando especificamente no receptor nicotínico pós-sináptico, diminuindo a sensibilidade deste para a acetilcolina (Rodríguez *et al.*, 2006).

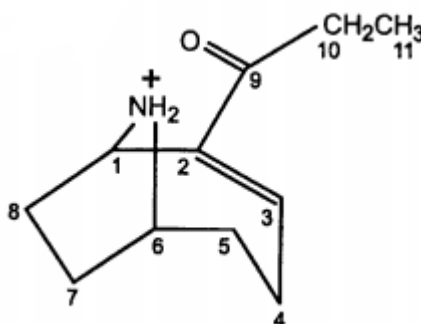


Figura 1.2 - Estrutura química da Homoanatoxina-a (Briand *et al.*, 2003)

### 1.2.1.3 Anatoxina-a(s)

Esta cianotoxina é um organofosforado natural. Na verdade, é o único organofosforado produzido naturalmente conhecido até a data (Vasconcelos, 2001). Caracteriza-se por ser um éster metílico da N-hidroxiguanidina fosfato (figura 1.3), de massa molecular 252 Daltons, e por ser química e fisiologicamente diferente das outras anatoxinas (Rodríguez *et al.*, 2006). O “S” deriva da excessiva salivação observada em vertebrados sujeitos à administração desta toxina e é produzida por alguns géneros de *Anabaena flos-aquae* (Dow & Swoboda, 2000; Haider *et al.*, 2003). Actua como um insecticida organofosforado inibidor irreversível de acetilcolinesterase (Funari & Testai, 2008; Rodríguez *et al.*, 2006). A inibição desta enzima impede a hidrólise da acetilcolina, induzindo a uma excessiva estimulação colinérgica e abertura dos canais iónicos, até provocar a exaustão do músculo (Rodríguez *et al.*, 2006).

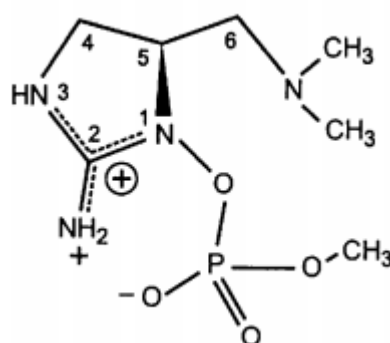


Figura 1.3 - Estrutura química da Anatoxina-a(s) (Briand *et al.*, 2003)

### 1.2.1.4 Aphanotoxinas I e II (saxitoxinas e neosaxitoxinas)

Estas toxinas possuem uma estrutura tri-cíclica com anéis de hidropurina (figura 1.4). Tal como as anteriores neurotoxinas, as saxitoxinas e neosaxitoxinas quebram a ligação entre neurónios e células musculares, mas fazem-no impedindo os neurónios de libertarem a acetilcolina. Para segregarem a acetilcolina ou outro neurotransmissor, os neurónios têm primeiro de gerar impulso eléctrico. Este tem de se propagar ao longo do axónio, e esta actividade depende do fluxo de iões de sódio e potássio entre os canais da membrana axonal. Quando o impulso atinge o axónio, o terminal liberta a acetilcolina. A saxitoxina e

neosaxitoxina bloqueiam o fluxo de iões em todos os canais da membrana, prevenindo a secreção da acetilcolina (Haider *et al.*, 2003).

As saxitoxinas são mais conhecidas por PSP's (Paralytic Shellfish Poisons) e a sua produção está associada às algas marinhas dinoflageladas responsáveis pelas "marés vermelhas". No entanto, este grupo de neurotoxinas foi também detectado em quantidades relevantes em alguns géneros de cianobactérias de água doce como *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei* e *cylindropermopsis raciborskii* (Dow & Swoboda, 2000; Sivonen & Jones, 1999).

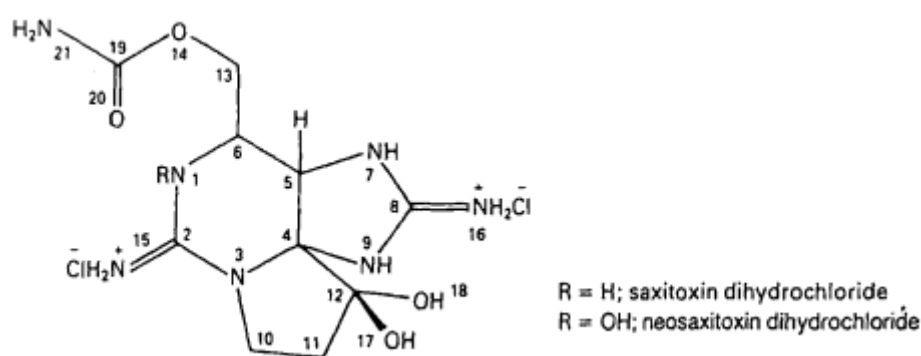


Figura 1.4 - Estrutura química geral das Saxitoxinas (Carmichael, 1992)

### 1.2.2 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas podem ser divididas em 3 grupos: microcistinas, nodularinas e cilindropermopsinas, de acordo com a sua estrutura química. Os dois primeiros grupos são peptídeos, enquanto que as cilindropermopsinas são alcalóides (Vasconcelos, 2001).

#### 1.2.2.1 Microcistinas

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos com uma estrutura geral ciclo (-D-Ala-L-X-erythro-BETA-methyl-D-isoAsp-L-Y-Adda-D-isoGlu-N-methyldehydro-Ala) (Figueiredo *et al.*, 2004). Podem ocorrer mudanças nos L-aminoácidos variáveis X e Y e também algumas modificações químicas (metilações, etc), levando à existência de mais de 60 variantes de microcistinas conhecidas actualmente (Vasconcelos, 2001).

O aminoácido Adda, ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico, é a estrutura responsável pelas propriedades tóxicas das microcistinas e

nodularinas (Figueiredo *et al.*, 2001). Em geral, modificações na estrutura deste aminoácido conferem menos ou nenhuma toxicidade às microcistinas (Duy *et al.*, 2000).

A variante mais estudada e frequentemente encontrada em meios aquáticos naturais é a microcistina-LR (MC-LR), com aminoácidos variáveis leucina (L) e arginina (R). Outras variantes que também ocorrem frequentemente são MC-RR, MC-YR e MC-LA (figura 1.5) (Figueiredo *et al.*, 2004).

Esta toxina foi isolada em vários géneros de cianobacterias: *Microcystis* (*aeruginosa*, *wesenbergii* e *viridis*), *Anabaena flos-aquae*, *Nostoc*, *Oscillatoria* (*Planktothrix agardhi*, *rubescens* e *tenuis*) (Sivonen & Jones, 1999; Duy *et al.*, 2000; Carmichael, 2001). Ocorre em todo o mundo em meios de água doce. Os factores ambientais que podem influenciar a produção de microcistinas pelas cianobactérias como nutrientes, luz, pH e temperatura, têm sido estudados em culturas *batch* e contínuas. A quantidade de microcistinas produzida por uma cultura de cianobactérias parece ser directamente proporcional à sua taxa de crescimento, não interessando os factores ambientais que limitam o crescimento (Sivonen & Jones, 1999). De um modo geral, a síntese destas aumenta com a intensidade da luz e varia com a qualidade da mesma (luz vermelha favorece a produção de toxinas enquanto que a luz azul não), no entanto, segundo Bottcher *et al.*, (2003) e Hesse & Kohl (2001), citados em Figueiredo *et al.*, (2004), alguns estudos concluíram que a variação da intensidade da luz em ambientes naturais tem pouco ou nenhum efeito sobre o conteúdo de toxinas nas células e, as diferenças de toxicidade encontradas entre florescências de uma mesma espécie devem-se principalmente às variações das taxas de crescimento e à variabilidade de toxicidade entre estirpes diferentes. A temperatura parece influenciar o tipo de toxina produzida, sendo que temperaturas elevadas (> 25º) favorecem a produção de MC-RR e temperaturas baixas favorecem a síntese de MC-LR (Rapala *et al.*, 1997; Rapala & Sivonen, 1998, citados em Figueiredo *et al.*, 2004). Em condições de pH baixo ou elevado, as células cianobacterianas parecem conter mais toxinas (Sivonen & Jones, 1999).

As microcistinas são toxinas intracelulares e, enquanto retidas dentro de células vivas degradam-se lentamente. São libertadas para a água por senescência, morte celular ou processos de tratamento de água. Uma vez libertas na água, podem persistir por um longo período de tempo antes de sofrerem biodegradação ou fotólise. Esta última ocorre mais rapidamente na presença de pigmentos fotossintéticos solúveis e substâncias húmicas,



sendo a taxa de degradação dependente da concentração destes compostos (Sivonen & Jones, 1999).

Em meios naturais as microcistinas são susceptíveis de sofrer degradação por parte de uma bactéria. A bactéria capaz de as degradar é uma nova espécie de *Sphingomonas*, anteriormente conhecida por *Pseudomonas*. Estes microrganismos têm sido encontrados em águas residuais e massas de água naturais. Quebram as ligações da MC-LR, transformando-a num composto linear transitório, o que a torna quase 200 vezes menos tóxica (Duy *et al.*, 2000). Park *et al.*, (2001) reportaram uma degradação completa em 4 dias, quando a *Sphingomonas* foi adicionada a uma cultura de microcistinas. As taxas mais elevadas da degradação de MC-RR e de MC-LR foram de 13 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> e 5,4 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, respectivamente. As taxas da degradação foram fortemente dependentes da temperatura e a taxa máxima foi observada aos 30°C.

A hidrólise da MC-LR pode envolver pelo menos três enzimas. Uma enzima chamada *microcistinase*, que quebra a ligação de dois dos sete aminoácidos do heptapeptídeo cíclico. O produto linear resultante foi reportado como sendo 100 vezes menos tóxico (Pitois *et al.*, 2001).

A MC-LR e a maioria das suas congéneres são hidrofílicas e geralmente não são capazes de penetrar membranas celulares de vertebrados e, portanto, exigem um transportador dependente de energia (ATP). Um anião orgânico, até agora não identificado, ou o ácido biliar têm sido descritos como os transportadores de peptídeos cíclicos. Como resultado, a toxicidade da MC-LR é restrita a órgãos que apresentem este transportador nas suas membranas celulares, como o fígado (Hitzfeld *et al.*, 2000). Quando a administração da MC-LR em mamíferos é feita pela via oral, esta passa para a corrente sanguínea através do sistema de transporte dos ácidos biliares presentes nos hepatócitos. Uma vez nos hepatócitos, a MC-LR é um potente inibidor da proteína serina/treonina fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A). Estas enzimas desempenham um papel importante na manutenção da homeostasis na célula. A inibição destas enzimas leva à hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto, resultando na deformação dos hepatócitos. As substâncias que inibem estas enzimas são consideradas como potenciadoras do aparecimento de tumores (Sivonen & Jones, 1999).

Algumas substâncias químicas têm sido testadas em laboratório para impedir a hepatotoxicidade da microcistina. Destas incluem a ciclosporina A, a rifampina e a silemarina.

Estes antagonistas foram mais bem sucedidos quando administrados antes ou durante a administração da toxina (Rao *et al.*, 2002 citado em Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

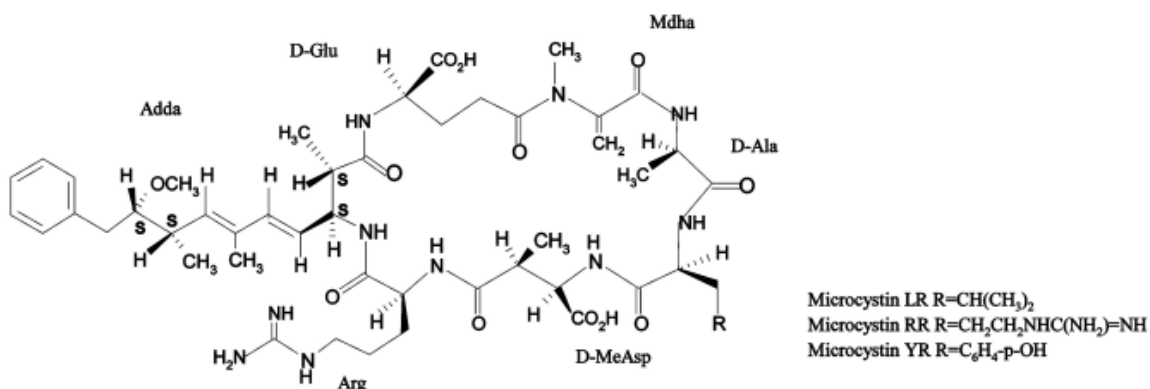


Figura 1.5 - Estrutura química das microcistinas mais comuns (Duy *et al.*, 2000)

#### 1.2.2.2 Nodularinas

As nodularinas apresentam uma estrutura semelhante às microcistinas, excepto no número de aminoácidos. São compostas por cinco aminoácidos em vez de sete, sendo o Adda um deles (Vasconcelos, 2001). A sua estrutura química (figura 1.6) é ciclo-(D-MeAsp1-L-Arg2-Adda3-D-Glu4-Mdha5) e apresenta um peso molecular de 824 Daltons. Foram encontradas sete variantes de nodularinas. Duas variantes desmetiladas, uma com D-Asp em vez de D-MeAsp, outra com DMAdda em vez de Adda. Uma variante não tóxica de nodularina contém 6Z-estereoisómero de Adda.

A nodularina é produzida apenas pela cianobactéria *Nodularia spumigena*. Uma toxina análoga à nodularina, a motuporina, é produzida por uma esponja marinha *Theonella swinhoei*. A motuporina apresenta o L-valina em vez de L-arginina (Sivonen & Jones, 1999).

A ocorrência de florescências de *N. spumigena* é determinada pela temperatura da água, intensidade de luz e concentração de nutrientes (Mazur & Plinski, 2003). A concentração intracelular desta toxina aumenta com o aumento da temperatura, da concentração de fosfato e da radiação. Diminui em condições de baixa e elevada salinidade e concentrações elevadas de azoto inorgânico (Lehtimäki (2000) citado em Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

O mecanismo de acção desta toxina é semelhante ao da microcistina. Em situações de exposição crónica a doses baixas, promovem o crescimento de tumores (Duy *et al.*, 2000).

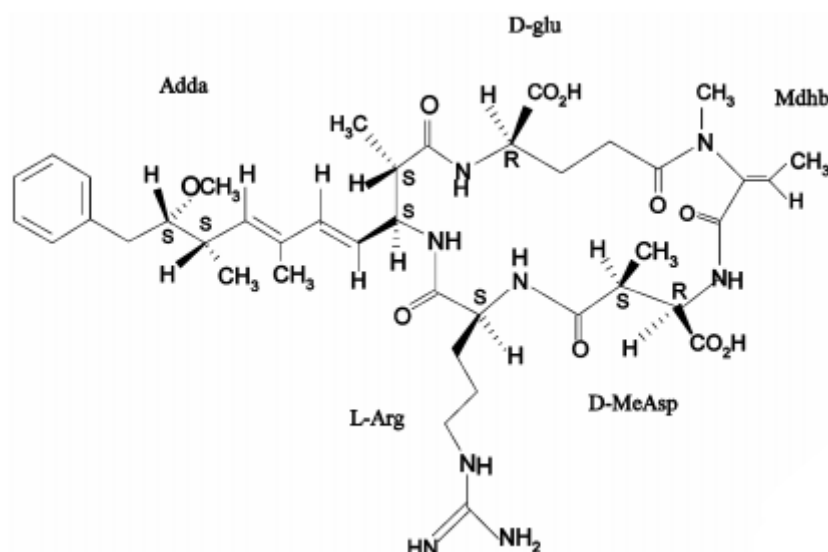


Figura 1.6 - Estrutura química da nodularina (Duy *et al.*, 2000)

### 1.2.2.3 Cilindropermopsinas

Até a data, estes alcaloídes são conhecidos por serem produzidos por *Cylindropermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon avalisporum* e *Umezakia natans* (Haider *et al.*, 2003), principalmente em zonas tropicais (Briand *et al.*, 2003).

A sua estrutura molecular (figura 1.7) consiste num tri-ciclo de guanidina combinado com um hidroximetil uracil (Funari & Testai, 2008), com um peso molecular de 415 Daltons (Briand *et al.*, 2003).

A Cilindropermopsina apresenta dois derivados, um deles tóxico, 7-epicilindropermopsina (Banker *et al.*, 1997) e outro praticamente não tóxico, deoxicilindropermopsina (Norris *et al.*, 1999).

Em florescências jovens, uma maior percentagem de cilindropermopsina foi encontrada na biomassa, enquanto que em florescências mais velhas a maior percentagem encontrava-se dissolvida na coluna de água. Em meios naturais, quando a biomassa entra em decomposição, a presença de pigmentos, enzimas e outros materiais promovem a degradação da cilindropermopsina (Chiswell *et al.*, 1999).

Esta toxina actua principalmente como um inibidor de síntese proteica. O seu alvo principal é o fígado, mas pode afectar outros órgãos como rins, baço, timo e coração (Hawkins *et al.*, 1997; Briand *et al.*, 2003)

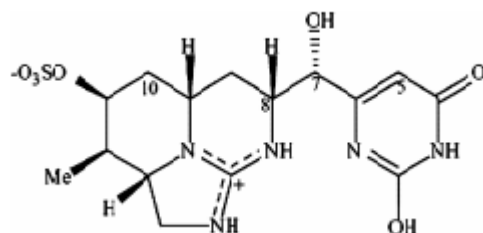


Figura 1.7 - Estrutura química da Cilindrospermopsina (Funari *et al.*, 2008)

### 1.2.3 Dermatoxinas

De entre outras, fazem parte deste grupo de toxinas a lingbiatoxina-a, aplisiatoxina e lipopolissacarídeos (LPS).

Sendo produzidas sobretudo pela cianobactéria marinha, *Lyngbya majuscula*, as dermatoxinas lingbiatoxina-a e aplisiatoxina estiveram relacionadas com episódios de dermatite aguda, envenenamento e morte animal, especialmente no Japão e Havai (Yasumoto, 1998; Osborne *et al.*, 2001, citados em Briand *et al.*, 2003). Estas toxinas são fortes promotoras de tumores (Fujiki, 1984 citado em Briand *et al.*, 2003).

Tal como nas bactérias Gram-negativas, as cianobactérias apresentam endotoxinas LPS na constituição da membrana celular, onde formam complexos com as proteínas e fosfolípidos, e são normalmente tóxicos. Têm uma estrutura geral comum, composta por três regiões estruturais. A parte interna é constituída por um lípido denominado lípido A que está ligado à membrana celular e que representa a região endotóxica do heteropolímero. A região média é constituída por um oligossacarídeo que liga o lípido A a um polissacarídeo externo. Os LPS das cianobactérias são menos tóxicos do que os LPS de *Salmonella* e do que as neuro e hepatotoxinas estando associados a casos de irritações cutâneas, gastrointestinais e alergias das vias respiratórias.

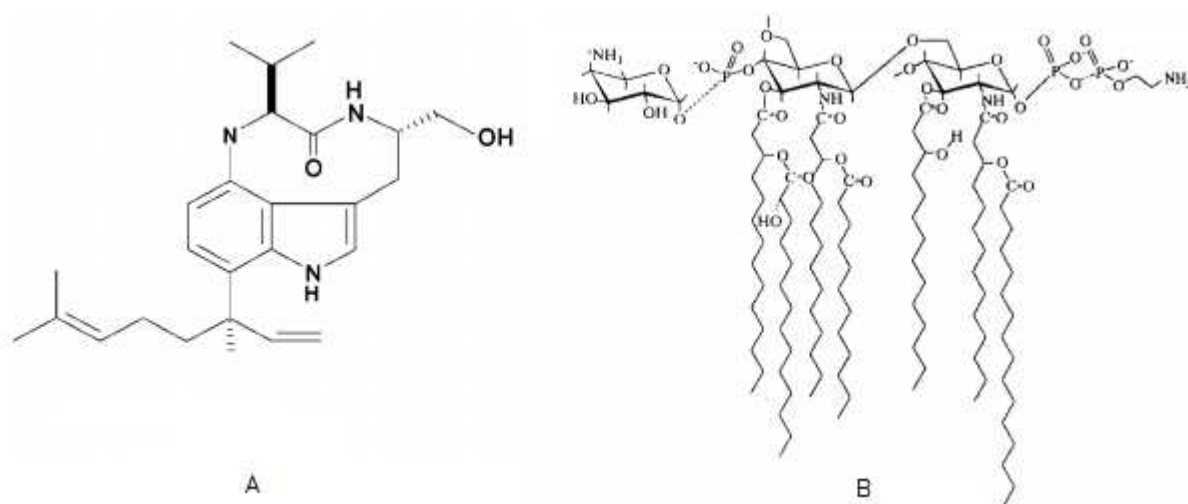


Figura 1.8 - Estrutura química da Lingbiatoxina-a (A) e da LPS (B) (Briand *et al.*, 2003)

### 1.3 Riscos de ocorrência de cianobactérias e de cianotoxinas

Muitas espécies produzem mais do que uma toxina, o que quer dizer que em meios naturais a mortalidade associada a estas espécies pode ser consequência de uma única toxina, da combinação de várias toxinas ou por outros compostos tóxicos não caracterizados. Mais, no caso de organismos aquáticos, pode ser simplesmente pela ocorrência da fluorescência, uma vez que esta altera as características da água aumentando os níveis de amónia, nitrato ou anoxia causada pela depleção dos níveis de oxigénio.

Os efeitos tóxicos das cianotoxinas são diversificados e podem ser melhor compreendidos quando separados em efeitos sobre organismos aquáticos, mamíferos e humanos.

#### 1.3.1 Organismos aquáticos

Embora muitos dos relatos de intoxicação animal envolvam vertebrados terrestres, os organismos aquáticos também são afectados pelos efeitos adversos das cianotoxinas. No entanto, em muitos casos a toxicidade é subletal e estes sobrevivem tempo suficiente para acumular toxinas e transferi-las ao longo da cadeia alimentar (Vasconcelos, 1999).

Vasconcelos (1991) citado em Vasconcelos (1999), referiu num estudo sobre o impacto de estirpes tóxicas e não tóxicas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* em espécies zooplanctónicas que, apesar de estas terem algum valor nutricional para o cladóceros *Ceriodaphnia pulchella*, causam morte ao sétimo dia. Um efeito maior foi observado para a *Daphnia longispina* com letalidade total ao quarto dia.

Bell & Codd (1996) citados em Siqueira & Oliveira-Filho (2005), demonstraram que a microcistina pode afectar a *Daphnia pulicaria*, reduzindo a sua capacidade de filtração e a sobrevivência das suas crias. Pela exposição à saxitoxina e à neosaxitoxina, Sasner *et al.*, (1984) citados em Siqueira & Oliveira-Filho (2005), observaram movimentos erráticos e paralisia da segunda antena da *Daphnia magna*, levando os organismos a afundar.

Relativamente a outros invertebrados, os moluscos parecem ser bastante tolerantes às cianotoxinas. Vasconcelos *et al.*, (1995), citados em Vasconcelos (1999), num ensaio com o mexilhão *M. galloprovincialis* alimentado com uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa*, concluíram que menos de 1% de mortalidade ocorreu no décimo sexto dia de exposição. Durante este período, os moluscos acumularam até 10,5 µg microcistina/ g de peso corporal seco.

Em testes com peixes, se as doses de cianotoxinas forem administradas intraperitoneal ou oralmente, os sintomas desenvolvidos são similares aos dos mamíferos de laboratório (Chorus & Bartram, 1999).

Numa florescência de cianobactérias no Reino Unido, após grande mortalidade de peixes, as análises aos mesmos mostraram que a morte ocorreu por severos danos nas brânquias, sistema digestivo e fígado. O dano nas brânquias ocorreu provavelmente na decorrência do pH elevado, induzido pela grande actividade fotossintética das cianobactérias. Este dano pode ter facilitado a intoxicação pela microcistina, levando posteriormente à necrose do fígado (Chorus & Bartram, 1999). Danos no coração, rim, baço e pele também foram observados em peixes (Duy *et al.*, 2000).

Em Agosto de 1999, durante uma florescência de *N. spumigena* no Golfo da Finlândia, no Mar Báltico, foram encontrados peixes (*Gasterosteus aculeatus*) a flutuar sobre a superfície. Estes tinham cerca de 35-170 µg nodularina/kg de peso seco (Kankaanpää, 2001 citado em Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Foi administrada oralmente à truta marinha (*S. trutta*) nodularina. O nível de exposição foi de 210-620 µg nodularina/Kg de peso seco. As análises mostraram lesões hepáticas graves, mas reversíveis (Kankaanpää, 2002 citado em Van Apeldoorn *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Mamíferos

Os sintomas causados pela intoxicação dependem da via de contaminação, da dose ingerida e do tipo de toxina, dado que cada uma possui um mecanismo próprio de toxicidade e diferentes efeitos. Na tabela 1.4 apresentam-se os mecanismos de toxicidade, LD<sub>50</sub> e observações clínicas que cada uma possui quando testadas intraperitonealmente em ratos.

**Tabela 1.4 - Toxicidade de cianotoxinas em mamíferos (Adaptado: Haider *et al.*, 2003)**

<b>Efeito</b>	<b>Cianotoxina</b>	<b>Mecanismo de toxicidade</b>	<b>LD<sub>50</sub> (µg/Kg)</b>	<b>Observações clínicas</b>
Neurotóxico	Anatoxina-a	Inibição da acetilcolina	200	Salivação, convulsões, paralisia corporal, morte por paragem respiratória
	Homoanatoxina-a		250	
	Anatoxina-a(s)	Inibição irreversível da acetilcolinesterase	20	Salivação excessiva, convulsões, tremores, diarreia, vômitos e morte rápida, dispneia
	Saxitoxinas	Bloqueio dos canais de sódio. Inibição da transmissão nervosa	10	Idem anatoxina-a e homoanatoxina-a
Hepatotóxico	Microcistinas	Inibição da fosfatase 1 e 2A, promotor tumoral	50 - 60	Graves lesões e hemorragia hepáticas, insuficiência cardíaca e morte; Outros órgãos podem ser afectados como rins, pulmões e intestinos; Promove o aparecimento de tumores
	Nodularinas	Inibição da fosfatase 1 e 2A, promotor tumoral	30 - 50	Morte por hemorragia ou insuficiência hepática
	Cilindropermopsinas	Inibição da síntese proteica	2100 - Morte em 24h; 200 - Morte em 5-6 dias	Lesão tecidual com necrose celular no fígado, rins, glândulas supra-renais, pulmões, coração, baço e timo

Tabela 1.4 – (Continuação)

Efeito	Cianotoxina	Mecanismo de toxicidade	LD <sub>50</sub> (µg/Kg)	Observações clínicas
Dermatológico	Lingbiatoxina-a, Aplisiatoxina, LPS	Aparecimento de vesículas nas regiões em que ocorreu o contacto directo	-	Gastroenterite, irritação cutânea, ocular, reacções alérgicas, aparecimento de tumores

### 1.3.3 Humanos

A exposição humana a cianotoxinas pode ocorrer através de hemodiálise, ingestão de água potável e actividades recreacionais em lagos e rios. Na tabela 1.5 são apresentados alguns casos de doença em humanos atribuídos a estas vias de contaminação.

Tabela 1.5 - Casos de toxicidade humana associada à exposição de cianobactérias (Adaptado: WHO, 2003)

Doença atribuída a cianotoxinas na prática de actividades recreativas	
1959	<b>Canadá:</b> Apesar da morte de rebanhos e avisos contra a prática recreativa, as pessoas nadaram num lago contaminado com cianobactérias. Treze pessoas ficaram doentes (dor de cabeça, náuseas, dores musculares, diarreia). Foram encontrados nas fezes de um paciente células de <i>Microcystis spp.</i> e tricomas de <i>Anabaena circinalis</i> .
1989	<b>Reino Unido:</b> Dez de vinte soldados ficaram doentes depois de nadarem e treinarem numa água com fluorescência de <i>Microcystis spp.</i> ; dois desenvolveram pneumonia grave atribuída à inalação de microcistinas.
1995	<b>Austrália:</b> Um estudo envolvendo 852 participantes que estiveram em contacto com água contaminada em pratica recreativa, mostrou a incidência de efeitos adversos como diarreia, vômitos, sintomas de gripe, irritações cutâneas, úlceras na boca, febre, e irritações nos olhos e ouvidos durante 2 a 7 dias após a exposição.



Tabela 1.5 – (Continuação)

Doença atribuída a cianotoxinas na água potável	
1979	<b>Austrália:</b> O combate a uma florescência de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> num reservatório de água potável em Palm Island com sulfato de cobre, levou à libertação de toxinas para a água, resultando na hospitalização de 141 habitantes.
1981	<b>Austrália:</b> Na cidade de Armindale, a actividade de enzimas hepáticas mostraram ser elevadas no sangue de uma população abastecida com água superficial, poluída por <i>Microcystis spp.</i>
1985	<b>USA:</b> Carmichael (1994) compilou casos de estudos sobre náuseas, vômitos, diarreia, febre e infecções nos olhos, ouvidos e garganta após a exposição a florescências de cianobactérias.
1993	<b>China:</b> A incidência de cancro do fígado foi relacionada com fontes de água, e era significativamente maior em populações que utilizavam águas superficiais contaminadas com cianobactérias do que as que utilizavam águas subterrâneas.
1994	<b>Suécia:</b> O uso ilegal de água não tratada numa fábrica de açúcar levou a um cruzamento accidental com o abastecimento de água potável por um número incerto de horas. A água estava densamente povoada por <i>Planktothrix agardhii</i> e as amostras colhidas alguns dias antes e alguns dias após o incidente mostrou a presença de microcistinas. 121 dos 304 habitantes da vila ficaram doentes, com vômitos, diarreia, câibras musculares e náuseas.
Doença atribuída a cianotoxinas na água usada para hemodiálise	
1975	<b>USA:</b> Choque endotóxico de 23 pacientes de hemodiálise em Washington DC, foi atribuído a uma florescência de cianobactérias num reservatório de água potável.
1996	<b>Brasil:</b> 131 pacientes de hemodiálise foram expostos à microcistinas presentes na água usada para a diálise. 56 morreram, pelo menos 44 apresentaram sintomas associados à contaminação de microcistinas, hoje referido como o “síndrome de Caruaru”. A quantidade de microcistinas encontrada no fígado dos pacientes correspondia à dose letal administrada em laboratório em experiências com animais.

#### 1.4 Ocorrência de cianobactérias e suas toxinas em Portugal

A ocorrência de florescências de cianobactérias é comum em ecossistemas de água doce portugueses e têm sido reportadas desde 1930 (Sampaio, 1933 citado em Pereira *et al.*, 2000). No entanto, a sua toxicidade começou a ser reportada desde o início dos anos 90 (Vasconcelos, 1993 citado em Pereira *et al.*, 2000). Desde então a maioria das florescências tóxicas têm sido atribuídas à presença de *Microcystis aeruginosa*. Outros géneros potencialmente tóxicos que também ocorrem são *Anabaena spp.*, *Aphanizomenon spp.*, *Cylindrospermopsis spp.* e *Oscillatoria* (Vasconcelos, 1994 citado em Pereira *et al.*, 2000).

Um estudo sobre a ocorrência de cianobactérias tóxicas foi conduzido entre 1989 e 1992. Trinta lagos, rios e reservatórios foram amostrados e analisadas amostras de 30 florescências. Dezoito das trinta amostras mostraram ser hepatotóxicas em ensaios com ratos. As espécies dominantes foram *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *Anabaena flos-aquae*, *A. Sheremetievi* e *Aphanizomenon flos-aquae*. Não foram encontradas florescências neurotóxicas (Vasconcelos, 1994 citado em Vasconcelos, 1999).

Oliveira (1995) citado em Vasconcelos (1999) reportou que uma florescência colhida no lago Mira (norte de Portugal) constituída maioritariamente por *Aphanizomenon flos-aquae* era tóxica para ratos. Na verdade, a exposição intraperitoneal revelou que a morte ocorria rapidamente (menos de 2 minutos) sem danos visíveis de órgãos internos. É de notar que este género de cianobactéria pode produzir também neurotoxinas como PSP ou anatoxina-a. Ferreira (1994) citado em Vasconcelos (1999) isolou *A. Flos-aquae* de uma florescência do rio Douro e detectou toxinas PSP's.

Em Maio de 1996, o reservatório de Montargil foi alvo de florescência cianobacteriana, com predominância de *Aphanizomenon flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa* (Pereira *et al.*, 2000). Em Janeiro de 2007, a lagoa das Furnas (Açores) apresentou uma florescência de cianobactérias nunca antes observado, com um aspecto macroscópico de manchas azuis esverdeadas e um cheiro desagradável. A florescência era constituída fundamentalmente por *Microcystis aeruginosa*, tendo como espécies subdominantes *Microcystis flos-aquae* e *Woronichinea naegeliana* (Pacheco *et al.*, 2008)

Santos *et al.*, (2008), num estudo sobre a variação sazonal e em profundidade da concentração de microcistinas na lagoa das Sete - Cidades (Açores), decorrente entre 2004 a 2006, reportaram que a ocorrência de florescências de cianobacterias foi permanente durante este período, mesmo nas épocas de inverno. Os géneros mais frequentes foram *Microcystis* spp. (principalmente *Microcystis aeruginosa*), *Coelosphaerium* sp., *Pseudananbaena* sp. e *Woronichinia naegeliana*, todos eles produtores de toxinas. A análise das amostras recolhidas confirmou a presença de microcistinas solúveis e intracelulares.

### 1.5 Legislação e Regulamentação

Em 1998 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um valor provisório para microcistinas (expresso em MC-LR) em água potável de 1 µg/L, o qual permite alguma segurança para um consumo a longo prazo. Este valor é válido também para alguns países como Brasil, Nova Zelândia, Reino Unido e Portugal. Aqui o valor limite de ocorrência de MC-LR é regulamentado pelo Decreto-lei nº 306/2007, relativo à qualidade da água para consumo humano.

Apesar de a MC-LR ser a variante mais tóxica e encontrada frequentemente, as restantes variantes destas toxinas e outras cianotoxinas apresentam também níveis significantes de toxicidade, sendo que a presença destas deveria também ser considerada um risco para a saúde pública. Por esta razão, e com base em ensaios laboratoriais alguns investigadores propuseram valores limites para a ocorrência destas, os quais chegaram a ser adoptados por alguns países (tabela 1.6).

**Tabela 1.6 - Valores limite de cianotoxinas em água para consumo humano**

Grupo de toxinas	Toxina	Limite	Referência
Neurotoxinas	Anatoxina-a	3 µg/L	Svrcek & Smith, 2004
	Saxitoxinas	3 µg/L (Austrália)	Svrcek & Smith, 2004; Fitzgerald, 2001
Hepatoxinas	Microcistina	1 µg/L	WHO, 1998
		1 µg/L (Brasil, Nova Zelândia, Reino Unido)	Van Apeldoorn <i>et al.</i> , 2007
		1,5 µg/L (Canadá)	Canada Health citado em Van Apeldoorn <i>et al.</i> , 2007
		1,3 µg/L (Austrália)	Svrcek & Smith 2004
	Nodularina	1 µg/L	Fitzgerald, 2001
		10 µg/L (exposição a curto prazo)	Fitzgerald <i>et al.</i> , 1999
	Cilindrospermopsina	1 µg/L (Austrália)	Carmichael, 2001; USEPA, 2001
		1 µg/L (Canadá)	Svrcek & Smith 2004

Estes valores dizem respeito apenas à ocorrência de toxinas em água para consumo humano, não estando abrangido outros usos.

Dado que a exposição a estas toxinas ocorre também através de práticas recreativas, e que um único valor de orientação para uma única toxina não se adequa, a OMS definiu uma série de valores de orientação em três níveis de probabilidade de ocorrência de toxinas nestes meios (tabela 1.7).

**Tabela 1.7 - Valores de orientação para águas de recreio (Adaptado: WHO, 2003)**

Valor limite ou situação	Origem do valor limite	Riscos para a saúde
<b>Baixa probabilidade de efeitos adversos para a saúde</b>		
20 000 Células de cianobactérias/mL ou 10 µg clorofila-a/L com dominância de cianobactérias	A partir de estudos epidemiológicos de práticas recreativas.	. Resultados adversos a curto prazo: Irritações cutâneas, doenças gastrointestinais
<b>Probabilidade moderada de efeitos adversos para a saúde</b>		
100 000 Células de cianobactérias/mL ou 50 µg clorofila-a/L com dominância de cianobactérias	A partir do valor provisório de orientação da Microcistina-LR e dados relativos a outras cianotoxinas	. Risco de doença a longo prazo com algumas espécies de cianobactérias; . Resultados adversos a curto prazo: Irritações cutâneas, doenças gastrointestinais;
<b>Alta probabilidade de efeitos adversos para a saúde</b>		
Formação de espuma em áreas onde ocorre risco de contacto de toda superfície do corpo ou risco de ingestão/aspiração	. Envenenamento animal via oral; . Casos reportados de doença humana.	. Risco de intoxicação aguda; . Risco de doença a longo prazo com algumas espécies de cianobactérias; . Resultados adversos a curto prazo: Irritações cutâneas, doenças gastrointestinais;

## 1.6 Influência de metais (Fe e Al) sobre a produção de toxinas intracelulares

Os microrganismos interagem continuamente com iões inorgânicos, alguns dos quais são essenciais para funções biológicas, enquanto outros exercem efeitos inibitórios que limitam o desenvolvimento normal (Piña & Cervantes, 1996).

O ferro é bem conhecido por ser um metal essencial para a comunidade fitoplanctônica, contribuindo para o seu crescimento e desempenhando um papel fundamental em co-factores enzimáticos do metabolismo celular, como por exemplo, fixação de azoto, assimilação de nitrato, respiração, síntese de clorofila e fotossíntese.

A deficiência deste nutriente inibe o crescimento celular, alguns processos enzimáticos e leva também à modificação dos pigmentos fotossintéticos. Öquist (1971, 1974) citado em Paczuska & Kosakowska (2003) foi o primeiro investigador a demonstrar mudanças específicas nos pigmentos sob condições de stress de ferro.

As cianobactérias especializaram-se em mecanismos de captação de ferro que envolvem a produção de compostos com baixo peso molecular, chamados sideroforos que são segregados para absorver o ferro da coluna de água.

Quanto à influência deste nutriente na produção de toxinas, a literatura reporta alguns ensaios laboratoriais com resultados e conclusões contraditórios.

Quando Lukac e Aegerter (1993) analisaram a influência de metais em concentrações vestigiais no crescimento e produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa*, descobriram que o ferro influenciava a produção de toxinas. Esta aumentava com a diminuição da concentração de ferro.

Utkilen & Gjølme (1995) obtiveram resultados opostos. Concluíram que condições limitantes de ferro influenciam a produção de microcistina por *Microcystis aeruginosa* (CYA 228/1). Descobriram que a diminuição da concentração de ferro no meio de cultura resultava na diminuição da concentração de toxinas. Descobriram também que estirpes produtoras de toxinas têm um sistema de absorção de ferro mais eficiente que estirpes não produtoras de toxinas.

Os resultados obtidos por Amé & Wunderlin (2005), utilizando uma amostra de *Microcystis aeruginosa* concentrada a partir de uma população selvagem, mostraram que os níveis de microcistinas são favorecidos pelo aumento da concentração de ferro no meio de cultura.

Os resultados obtidos por Sevilla *et al.*, (2008), sugeriram que a deficiência em ferro poderia ser um dos factores indutores da síntese de microcistinas. As células da cultura com ausência ferro apresentaram menores níveis de crescimento e de clorofila *a*, no entanto, maiores níveis de microcistinas do que as da cultura controle.

Li *et al.*, (2008) concluíram que o ferro é um micronutriente importante para *Microcystis novacekii* (UAM 250). O crescimento, concentração intracelular e extracelular de microcistinas foram máximos na maior concentração de ferro testada (5 µM). Neste ensaio foram identificados três tipos de microcistinas: -LR, -YR, -RR.

É possível que a discrepância destes resultados possa dever-se às diferentes estirpes usadas ou efeitos da degradação de toxinas (Li *et al.*, 2008).

Num ensaio para avaliar se o ferro é um factor limitante para a florescência de *Nodularia spumigena*, Paczuska & Kosakowska (2003) observaram que sob condições de “stress” de ferro houve inibição de crescimento, declínio progressivo dos pigmentos e morte celular. Ao enriquecer o meio com ferro, este estimulou significativamente a taxa de crescimento e a produção de clorofila *a*.

Quanto ao alumínio, até agora não foi demonstrado ter uma função biológica.

Pettersson *et al.*, (1985), reportaram efeitos inibitórios do alumínio no crescimento, fotossíntese e fixação de azoto na *Anabaena cylindrica*.

Pettersson *et al.*, (1988), ao estudarem os efeitos do alumínio na absorção e metabolismo do fósforo pela cianobactéria *Anabaena cylindrica*, concluíram que o alumínio actua no metabolismo intracelular do fosfato, privando a absorção deste nutriente pela cianobactéria. Husani & Rai (1992) mostraram que a toxicidade do alumínio na cianobactéria *Nostoc linckia* aumentava em condições baixas de pH (de 4,5 a 7,5) e que o conteúdo de ATP era afectado pela combinação de alumínio e baixo pH. Além disso, o transporte de electrões foi inibido a pH 4,5 e 6, quando combinado com 0,6 e 0,8 mM de alumínio, respectivamente. Concluiu-se que o alumínio pára a síntese de ATP em níveis elevados de pH, mas liga-se ao ATP a valores baixos de pH.

Genter (1995) num ensaio desenvolvido para determinar os efeitos da acidificação e do alumínio na abundância e biomassa de espécies bênticas, concluiu que no tratamento com alumínio houve um aumento de algas, cianobactérias e clorofila *a*.

## **2 Objectivo**

O objectivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ferro e alumínio sobre o crescimento de cianobactérias recolhidas em meio natural, e a produção de toxinas pelas mesmas.





### 3 Metodologia

#### 3.1 Plano de trabalho

Para o prosseguimento dos objectivos foi adoptado o seguinte plano de trabalho.

Fase	Descrição
0	Revisão bibliográfica, definição e aprendizagem de técnicas operatórias e analíticas a utilizar nos ensaios de influência dos metais sobre o crescimento de cianobactérias e produção de microcistinas.
1	Ensaaios com o ferro
2	Ensaaios com o alumínio

#### 3.2 Ensaaios

Os estudos da influência de cada metal foram feitos separadamente, em duplicado, em ensaios com duração de sete dias. Foi utilizado o meio de cultura BG11 (Rippka *et al.*, 1979), o qual foi inoculado com uma amostra de água recolhida na lagoa das Furnas (Açores), com predominância de *Microcystis aeruginosa*. Foram testadas 4 doses de ferro (0, 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ) e de alumínio (0, 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ).

Para cada ensaio preparou-se 8L de meio de cultura, que depois de esterilizado, inoculado e homogeneizado, foi distribuído (1L) por erlenmeyers e a cada um deles adicionado a respectiva dose de ferro e de alumínio. No ensaio com o ferro o meio de cultura foi modificado ao ser preparado sem ferro. Como fonte dos metais em estudo, utilizou-se o sulfato de ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato de alumínio hexadecahidratado ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ ) para o ensaio com o ferro e alumínio, respectivamente. As culturas foram mantidas numa câmara de cultura Fitoclima 4600 – ARALAB, com um fotoperíodo de 12 horas e temperatura nocturna e diurna de 18°C e 22°C, respectivamente. A evolução do crescimento das culturas foi avaliada pela determinação de clorofila *a* e carbono orgânico particulado (COP). Estes parâmetros e o pH foram medidos regularmente ao longo do período de incubação, e as determinações de sólidos suspensos totais (SST) e toxinas foram efectuadas no final dos ensaios.

### 3.3 Metodologia analítica

#### 3.3.1 pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, que se traduz na medição da diferença de potencial existente entre um eléctrodo de vidro e um eléctrodo de referência. Foi utilizado um leitor InoLab WTW series.

#### 3.3.2 Sólidos Suspensos Totais (SST)

A determinação dos sólidos suspensos totais (SST) foi realizada segundo o método referido por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA AWWA WEF, 1998). Os sólidos em suspensão foram obtidos por filtração das amostras através de filtros de microfibras de vidro (GF/C, WHATMAN), previamente tarados, seguido de secagem a 105°C em estufa MEMMERT. As pesagens envolvidas foram realizadas numa balança analítica Mettler Toledo AG 204.

#### 3.3.3 Clorofila *a*

A clorofila *a* foi determinada de acordo com o método referido por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA/WEF, 1998). Para a filtração a vácuo utilizaram-se filtros de microfibras de vidro (GF/C, WHATMAN). Os pigmentos contidos na biomassa foram extraídos com acetona a 90%, em ambiente refrigerado durante 24 horas. A centrifugação dos extractos foi feita a 3000 rpm durante 20 minutos numa centrífuga KUBOTA 5800. A leitura das absorvências foi feita a 750nm e 664nm antes da acidificação, e a 750nm e 665nm após a acidificação com ácido clorídrico (HCL) 0,1N, em células de 1 cm de percurso óptico, num espectrofotómetro Pharmacia LKB – Ultrospec Plus spectrophotometer.

As quantidades de clorofila *a* contidas nas amostras foram calculadas de acordo com a equação:

$$Cla, mg/m^3 = \frac{26,7 \times [(A_{0664} - A_{0750}) - (A_{0665} - A_{0750})] \times V_1}{V_2 \times L}$$

Em que:

$V_1$  = volume do extrato, em L;

$V_2$  = volume de amostra, em  $m^3$ ;

$L$  = percurso óptico da célula, em cm;

$A_{0664}$  e  $A_{0750}$  = absorvências a 664 nm e 750 nm antes da acidificação;

$A_{0665}$  e  $A_{0750}$  = absorvências a 665 nm e 750 nm após a acidificação;

### 3.3.4 Carbono Orgânico Particulado (COP)

O carbono orgânico particulado (COP) foi determinado de acordo com o método referido em Limnological Analyses (Wetzel & Likens, 2000). A amostra foi filtrada em filtros de microfibras de vidro (GF/F, WHATMAN) previamente incinerados em forno de mufla HERAEUS a 500°C durante uma hora. Os filtros contendo matéria orgânica foram colocados em erlenmeyers e secos numa estufa MEMMERT a 100°C durante uma hora. Depois de arrefecidos, adicionaram-se os volumes adequados de solução oxidante de ácido sulfúrico-dicromato e de água destilada (tabela 4.1). Cobriram-se imediatamente as soluções e seguidamente foram colocadas numa estufa MEMMERT a 100°C durante uma hora.

As soluções foram arrefecidas em banho de água e transferidas para provetas. Depois de decantado o material não digerido e as fibras do filtro, as soluções foram centrifugadas a 2000 rpm durante cinco minutos numa centrífuga KUBOTA 5800. Foram medidas as absorvências das soluções a um comprimento de onda de 440 nm, em células de 1 cm de percurso óptico, num espectrofotómetro Pharmacia LKB – Ultrospec Plus spectrophotometer.

Para cada grupo de amostras efectuou-se um ensaio em branco em duplicado e a calibração da solução oxidante com a solução de glucose.

**Tabela 3.1 - Volumes de reagentes utilizados na determinação do COP**

	Vol. Oxidante (mL)	Vol. água dest. (mL)	Sol. Glucose (mL)
<b>Amostra</b>	2	0,8	-
<b>Branco</b>	2	0,8	-
<b>Padrão (1 e 2)</b>	10	4	-
<b>Padrão (3, 4 e 5)</b>	10	-	4

O factor de calibração da solução oxidante com o padrão de glucose foi determinado de acordo com a equação:

$$F = \frac{120}{Ec}$$

Em que,  $Ec$  é a absorvência média corrigida dos três padrões.

Os valores de COP foram determinados de acordo com a equação:

$$mgC.m^{-3} = \frac{(1,1E)FvF'}{V}$$

Em que

$E$  = absorvência média das amostras a 440nm;

$F$  = factor de calibração da solução padrão de glucose;

$v$  = volume de oxidante utilizado;

$F'$  = factor para o volume de oxidante, volume de água destilada utilizado e percurso óptico (5);

$V$  = volume de amostra filtrada.

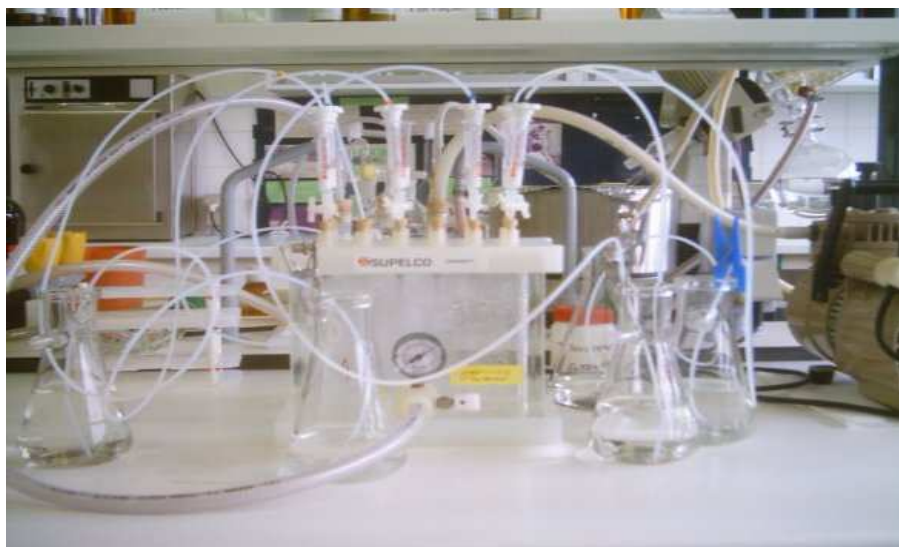
### 3.3.5 Toxinas

A detecção e quantificação de toxinas foram feitas por HPLC. Este método tem por base a leitura cromatográfica dos elementos constituintes de uma amostra, comparando o tempo de retenção do padrão, com o tempo de retenção das moléculas a investigar. O padrão utilizado para este trabalho foi a MC-LR com tempo de retenção de 16,43 minutos.

Filtraram-se 150 mL de amostra através de filtros de microfibra de vidro (GF/F, WHATMAN), para separar as toxinas solúveis na água (extracelulares) das toxinas associadas às células (intracelulares).

As microcistinas solúveis foram extraídas da amostra filtrada usando colunas de extracção em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extration*) do tipo C18 (Sep-pak cartridge vac 6cc) da Waters, previamente condicionadas com metanol e água, a um fluxo não superior a

10 mL.min<sup>-1</sup>. As colunas foram lavadas com 4 mL de metanol a 20% (figura 3.1). As toxinas foram depois eluídas com 2 mL de metanol acidificado com ácido trifluoracético (TFA) (0,1%). Os eluídos recolhidos foram evaporados em corrente de azoto até à secura. Os resíduos foram redissolvidos em 250 µL de metanol a 50%, centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm em centrífuga EPPENDORF 5415D, e os sobrenadantes posteriormente analisados por HPLC.



**Figura 3.1 - Montagem da extração de toxinas da fase solúvel**

Os filtros contendo a biomassa foram extraídos com 10 mL de metanol por duas vezes (primeiro durante 24 horas no congelador e depois durante uma hora à temperatura ambiente). Os extractos foram centrifugados, os sobrenadantes decantados e evaporados à secura, em evaporador rotativo, a 40°C. Os resíduos foram redissolvidos num volume conhecido de metanol 50%, centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm na centrífuga EPPENDORF 5415D e os sobrenadantes submetidos a análise por HPLC.

As toxinas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por varrimento de fotodíodos (HPLC/PDA). O instrumento utilizado para a análise foi um cromatógrafo da Dionex equipado com detector UV-VIS (UVD 340S) e software Chromeleon para processamento de dados cromatográficos. A separação das toxinas foi efectuada numa coluna C18 em fase reversa (3µm, 4,6x150mm, Acclaim 120 da Dionex), a temperatura controlada (40°C). A fase móvel foi composta por acetonitrilo e água, ambos acidificados com ácido trifluoracético, a 0,05% (v/v), utilizando gradiente de eluição, com um fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup> (figura 3.2).

Uma vez que não se encontram comercialmente disponíveis padrões para todas as toxinas eventualmente presentes, estas foram quantificadas através de uma curva de calibração de MC-LR. Os resultados obtidos foram expressos em concentração equivalente de MC-LR (equiv. MC-LR).



**Figura 3.2- Análise de toxinas por HPLC**

## 4 Resultados e Discussão

Os resultados apresentados correspondem à média dos resultados obtidos nos ensaios e respectivos duplicados.

### 4.1 pH

O pH não se manteve estável ao longo dos ensaios. De um modo geral sofreu um aumento ao longo dos dias, o que era de esperar devido ao aumento da actividade fotossintética das cianobactérias. Como encontrava-se sempre perto do limite do intervalo favorável à taxa de crescimento das cianobactérias, era corrigido para valores de 7,5 por adição de ácido clorídrico (HCL) 0,1N.

### 4.2 SST

A figura 4.1 representa a concentração de SST nos meios de cultura com o ferro. As culturas em que foram adicionadas doses de ferro tiveram valores de SST superiores à cultura sem adição de ferro. A dose que atingiu maior concentração de SST no final do ensaio foi a de 10  $\mu\text{M}$  Fe/L.

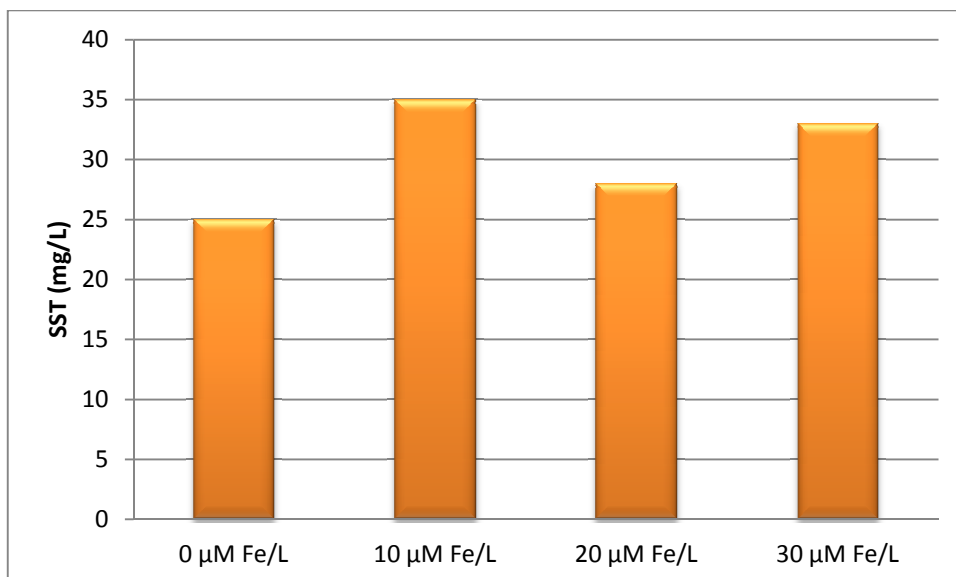


Figura 4.1 - Concentração de SST (mg/L) no final do ensaio com o ferro

No ensaio com o alumínio, registou-se uma diminuição da concentração de SST com o aumento das doses de alumínio (figura 4.2).

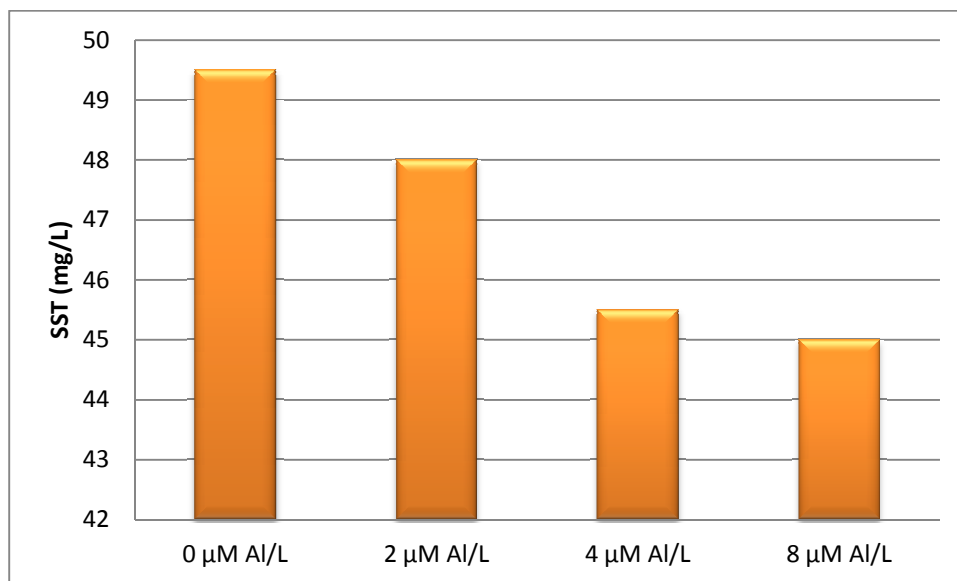


Figura 4.2 - Concentração de SST (mg/L) no final do ensaio com o alumínio

#### 4.3 Clorofila *a*

Durante o período experimental, registou-se um aumento da concentração de clorofila *a* em todas as culturas sujeitas a diferentes doses de ferro e de alumínio (figura 4.3 – 4.4).

Sob a influência do ferro, a dose de 30 µM Fe/L foi a que registou maiores concentrações de clorofila *a* até ao 5º dia do ensaio, e a dose de 10 µM Fe/L foi a que atingiu maior concentração deste pigmento no final do ensaio. Menores concentrações de clorofila *a* foram conseguidas na cultura sem adição de ferro. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Sevilla *et al.*, (2008), e confirmam que a produção de pigmentos depende da disponibilidade de ferro no meio.



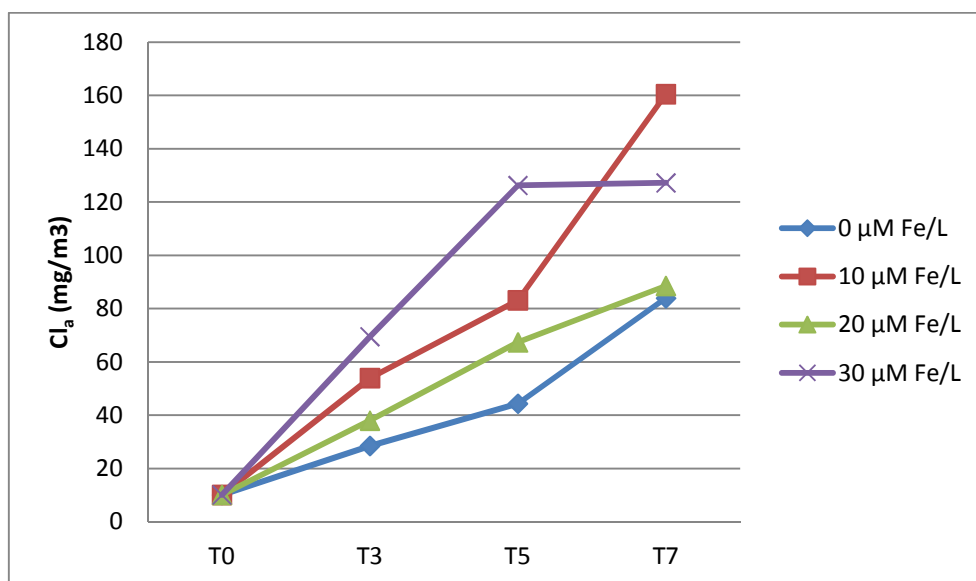


Figura 4.3 - Concentração de clorofila no ensaio com o ferro

Sob a influência do alumínio houve aumento de concentração de clorofila *a*. No entanto, a cultura sem adição de alumínio foi a que obteve maiores concentrações deste pigmento ao longo do período experimental, o que sugere que a presença de alumínio, inibe o crescimento de cianobactérias a produção de pigmentos. Pettersson *et al.*, (1985) registou também a inibição do crescimento ao avaliar o efeito do alumínio em culturas de *Anabaena cylindrica*.

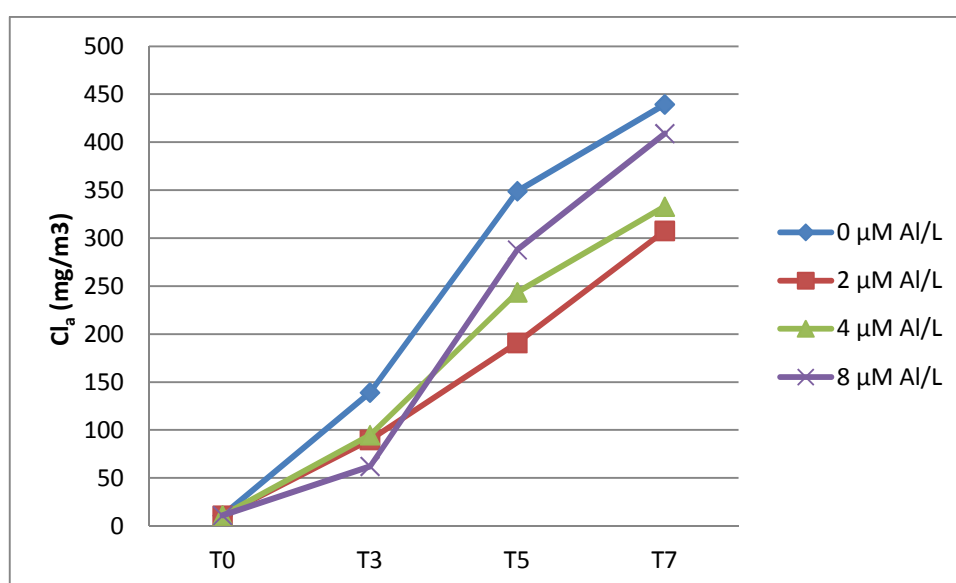


Figura 4.4 - Concentração de clorofila *a* no ensaio com o alumínio

#### 4.4 Carbono Orgânico Particulado

Registou-se um aumento da concentração de COP nas culturas ao longo do ensaio com ferro (figura 4.5), sendo mais significativa nas culturas com 10 e 30  $\mu\text{M}$  Fe/L. A cultura sem adição de ferro foi a que obteve menor concentração deste parâmetro, o que reforça a conclusão de que o ferro influencia positivamente o crescimento de cianobactérias.

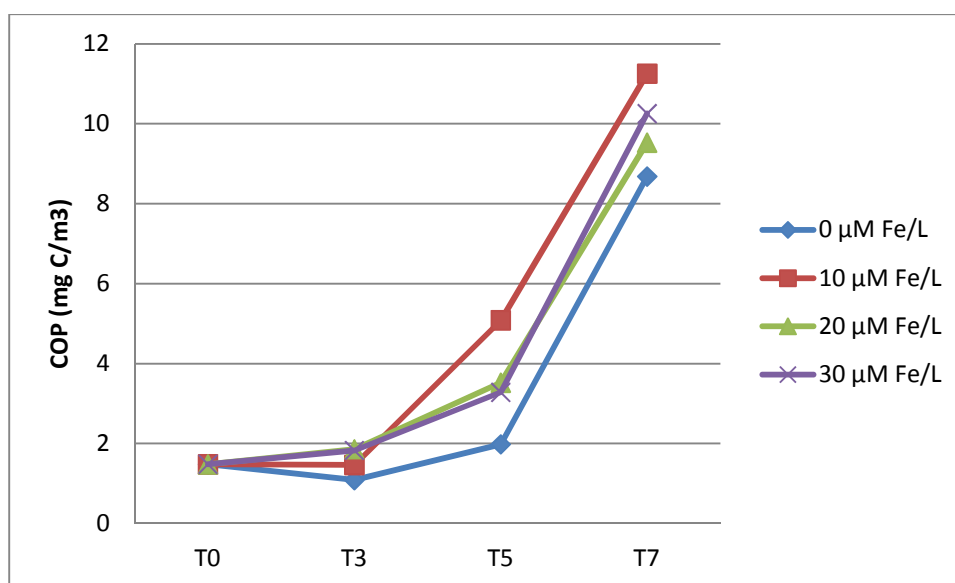


Figura 4.5 - Concentração de C.O.P (mg/m<sup>3</sup>) no ensaio com o ferro

Sob a influência de alumínio (figura 4.6), a concentração de COP também aumentou ao longo do ensaio. Mais uma vez, a cultura sem adição de alumínio foi a que apresentou maior concentração deste parâmetro ao longo do ensaio. O aumento de biomassa verificado em todas as culturas pode ser explicado pela tolerância das cianobactérias às doses de alumínio testadas.

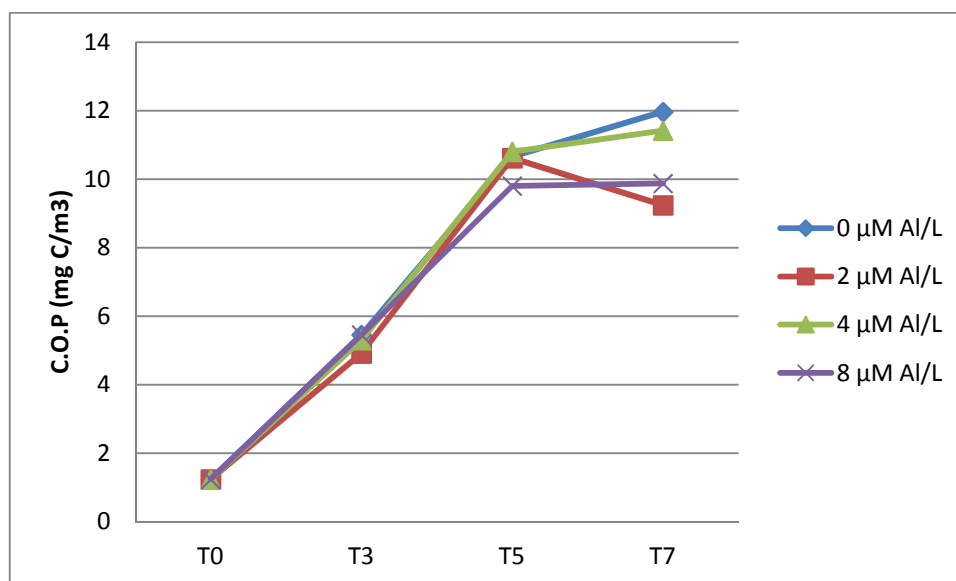
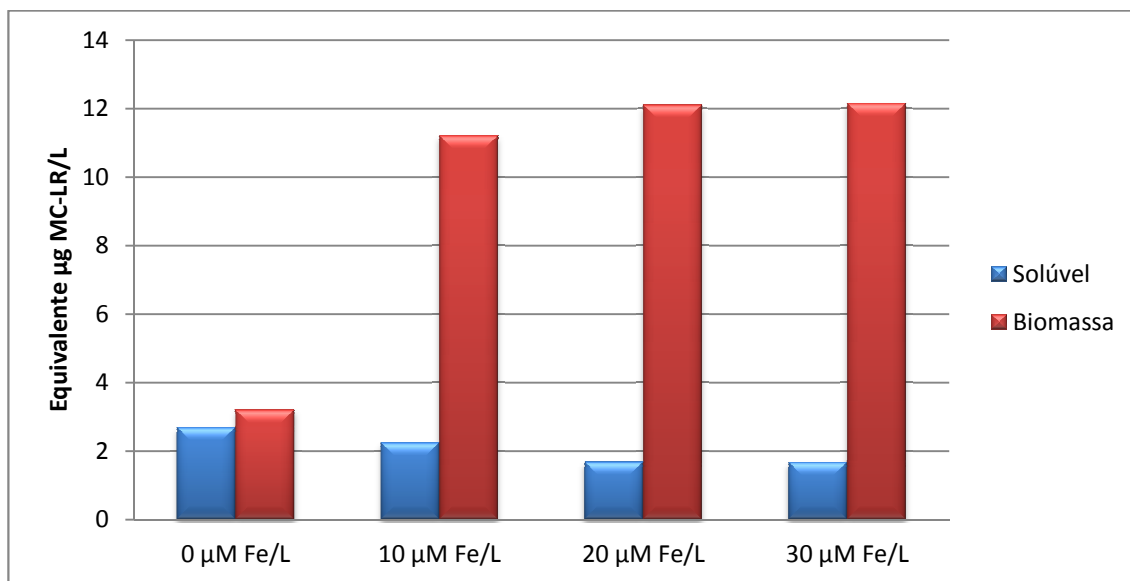


Figura 4.6- Concentração de C.O.P (mg/m<sup>3</sup>) no ensaio com o alumínio

#### 4.5 Toxinas

Analisando a figura 4.7 vê-se que com o aumento das doses de ferro houve um aumento da concentração de toxinas intracelulares (biomassa) e diminuição da concentração de toxinas extracelulares (em solução). A cultura sem adição de ferro foi a que registou menor concentração de toxinas intracelulares e maior concentração de toxinas extracelulares. A cultura com a maior concentração de ferro testada foi a que obteve maior concentração de toxinas intracelulares e menor concentração de toxinas extracelulares. Estes resultados sugerem que o ferro promove a produção de toxinas intracelulares e, facilita a sua manutenção no interior das células. Por outro lado, as doses testadas não terão sido suficientemente elevadas para que promovesse a morte e lise das células.

Apesar de haver diferenças nas espécies e doses testadas, os resultados do presente ensaio foram similares aos obtidos por Utkilen & Gjølme (1995), Amé & Wunderlin (2005) e Li *et al.*, (2008). Em todos estes trabalhos se verificou que o aumento da concentração de ferro favorece a produção de toxinas.



**Figura 4.7- Concentração de toxinas no ensaio com o ferro**

Para o alumínio, os resultados não foram tão lineares. Na figura 4.8 observa-se que a cultura sem adição de alumínio foi a que obteve maiores concentrações de toxinas, tanto intracelulares como extracelulares. Registou-se uma diminuição da concentração de toxinas intracelulares com o aumento da concentração de alumínio. Quanto à concentração de toxinas extracelulares, esta apresentou-se superior às das intracelulares em todos os ensaios, com excepção no de 2 µM/L. Perante isto e tendo em conta as concentrações de toxinas obtidas, os resultados sugerem que o alumínio não influencia a produção intracelular de toxinas e que promove a libertação das mesmas para a solução.

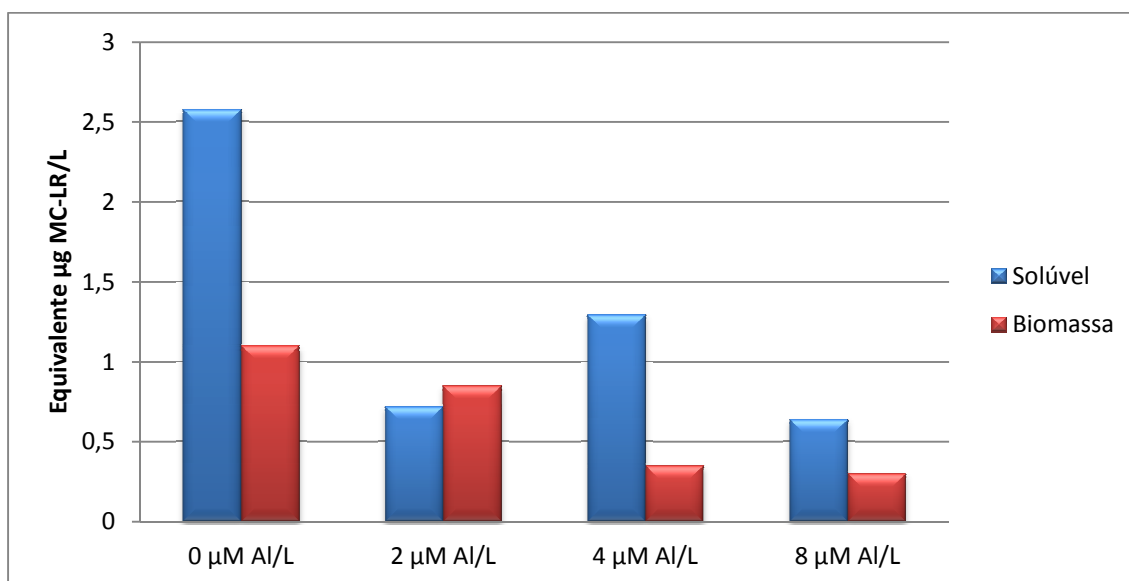


Figura 4.8 - Concentração de toxinas no ensaio com o alumínio

#### 4.6 Concentração de toxinas por unidade de biomassa (MC-LR:Cl<sub>a</sub> e MC-LR:COP)

A concentração de toxinas por unidade de biomassa, expresso em MC-LR: Cl<sub>a</sub> e MC-LR: COP nos ensaios com ferro está representada na figura 4.9. Estas relações apresentam um comportamento crescente até a dose de 20 µM Fe/L e sofrem um decréscimo na dose de 30 µM Fe/L. No entanto, a diferença de valores entre as culturas com estas doses não é muito significativa.

Conclui-se então que a produção de toxina por unidade de biomassa aumenta com o aumento da concentração de ferro nos meios de cultura.

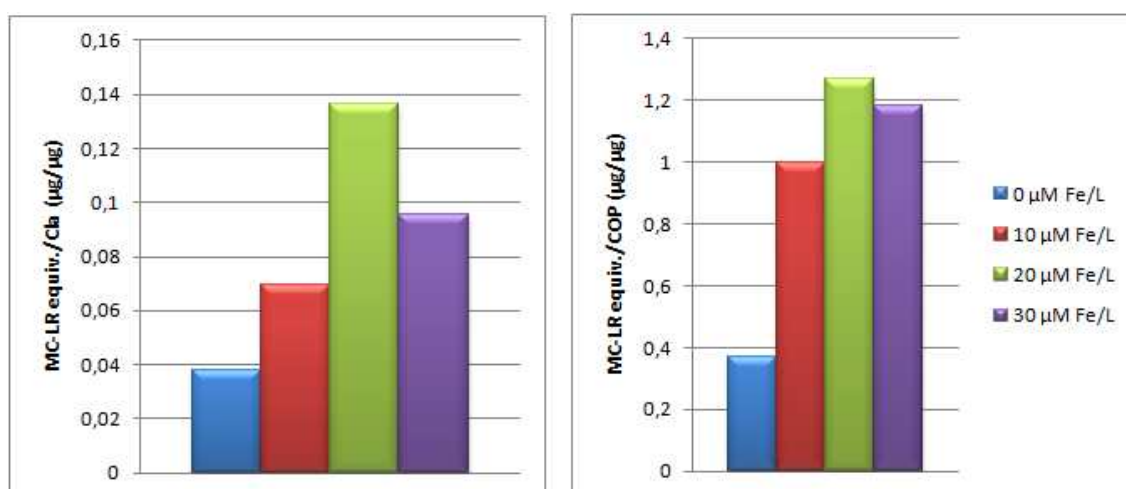


Figura 4.9 - Relação MC-LR: Cl<sub>a</sub> e MC-LR: COP para o ensaio com ferro

Para o alumínio as relações MC-LR:  $Cl_a$  e MC-LR:COP estão representadas na figura 4.10. Tendo em conta a pequena diferença de valores entre as doses 0 e  $2\mu\text{M Al/L}$ , a relação MC-LR:  $Cl_a$  apresenta um comportamento decrescente. A dose de  $8\mu\text{M Al/L}$  apresentou menor valor para esta relação, sendo possível concluir que esta cultura apresenta menor quantidade de toxina por unidade de biomassa.

A relação MC-LR: COP apresentou o mesmo comportamento decrescente, e registou valores mais elevados para as doses 0 e  $2\mu\text{M Al/L}$ .

Conclui-se então, que a produção de toxinas por unidade de biomassa é maior para as doses mais baixas de alumínio testadas, não tendo o alumínio potenciado a produção intracelular de toxinas

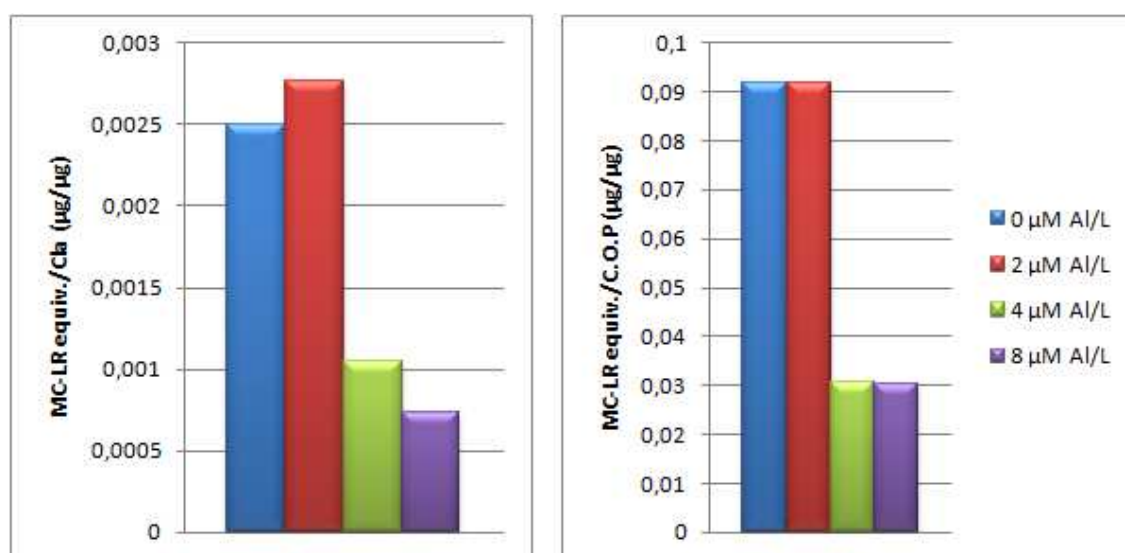


Figura 4.10 - Relação MC-LR:  $Cl_a$  e MC-LR: COP para o ensaio com alumínio

## 5 Conclusão

As culturas de cianobactérias apresentaram respostas diferentes de crescimento e produção de toxinas, para os metais em estudo.

Para o ferro registou-se um aumento significativo da biomassa e produção de toxinas intracelulares com o aumento das doses de ferro nos meios de cultura. A cultura sem adição de ferro foi a que apresentou menores valores de crescimento e produção de toxinas. A cultura com a maior dose de ferro testada (30  $\mu\text{M}$ ) foi a que apresentou maiores valores de crescimento até ao 5º dia do período experimental. A dose de 10  $\mu\text{M}$  foi a que apresentou maiores concentrações de Clorofila *a*, COP e SST no final do ensaio, parecendo constituir a dose óptima de metal para o crescimento das cianobactérias.

Relativamente à produção de toxinas, a concentração intracelular destas aumentou com o aumento das doses de ferro, e a extracelular diminuiu. Ou seja, a dose de 30  $\mu\text{M}$  apresentou maior concentração de toxinas intracelulares e menor concentração de toxinas extracelulares. Estes resultados confirmam a influência positiva do ferro no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e de toxinas por parte das cianobactérias. Por outro lado, a presença de ferro parece limitar a libertação de toxinas para o meio.

Face a estes resultados verifica-se haver necessidade de realizar mais ensaios com ferro, com doses superiores às testadas neste trabalho, com o objectivo de verificar até que dose a cultura mantém este comportamento crescente de crescimento, de produção de pigmentos e de toxinas.

Para o alumínio, tanto o crescimento como a produção de toxinas intracelulares foi maior na cultura sem adição deste metal. Para as restantes doses houve um aumento ao longo do tempo dos parâmetros avaliados, mas as suas concentrações finais foram sempre inferiores às da cultura sem adição de alumínio. As cianobactérias produziram menores quantidades de toxinas intracelulares, na presença de doses mais elevadas de alumínio. Por outro lado, as toxinas em solução apresentaram valores mais elevados que as intracelulares. Estes resultados apontam para o alumínio uma acção de inibição do crescimento e da produção de toxinas, facilitando a sua libertação para o meio exterior.

O facto de se ter realizado apenas uma réplica para cada ensaio constituiu uma limitação para este trabalho. Seria necessário realizar mais ensaios para confirmação dos resultados aqui apresentados.





## 6 Bibliografia

Amé, M. V., & Wunderlin, D. A. 2005. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. *Water, Air and Soil pollution*, 168, 235-248.

APHA/AWWA/WEF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Telsch, B., Porat, R., & Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of phycology*, 33 (4), 613-616.

Brandão, L. H., & Domingos, P. 2006. Factores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. *Saúde e Ambiente em revista*, 1 (2), 40-50.

Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., & Humbert, J.-F. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary research*, 34, 361-377.

Brock, T. D., & Madigan, M. T. 1991. The Bacteria. In *Biology of microorganisms* (pp. 703-790). New Jersey: Prentice-Hall International, Inc.

Campinas, M., Teixeira, R. M., Lucas, H., & Rosa, M. J. 2002. Previsão da capacidade de remoção de cianobactérias e cianotoxinas na ETA de Alcatarilha. *10º Encontro Nacional de Saneamento Básico*.

Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacterial secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 445-459.

Carmichael, W. W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "the cyanoHABs". *Human and ecological risk assessment*, 7 (5), 1393-1407.

Chiswell, R. K., Shaw, G. R., Eaglesham, G., Smith, M. J., Norris, R. L., Seawright, A. A., et al. 1999. Stability of Cylindrospermopsin, the toxins from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: effects of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environmental toxicology*, 14 (1), 155-161.

Chorus, I., & Bartram, J. 1999. *Toxic Cyanobacteria in water: A guide for their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon.

Figueiredo, D. R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonçalves, F. J., & Pereira, M. J. 2004. Microcystin-producing blooms: a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 151-163.

Figueiredo, D., Gonçalves, F., Azeiteiro, U. M., & Pereira, M. J. 2007. As cianobactérias. In F. Gonçalves, R. Pereira, U. M. Azeiteiro, & M. J. Pereira, *Actividades Práticas em Ciência e Educação Ambiental* (pp. 211-224). Lisboa: Instituto Piaget.

Figueiredo, D., Lopes, V., Gonçalves, A., Horta, C., & Pereira, M. 2007. Blooms cianobacterianos: A manta verde que cobre os lagos. In F. Gonçalves, R. Pereira, U. Azeiteiro, & M. Pereira, *Actividades práticas em Ciência e educação ambiental* (pp. 225-234). Lisboa: Instituto Piaget.

Dow, C. S., & Swoboda, U. K. 2000. Cyanotoxins. In B. A. Whitton, & M. Potts, *The Ecology of Cyanobacteria - Their diversity in Time and Space* (pp. 613-632). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Duy, T. N., Lam, P. K., Shaw, G., & Connell, D. W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 163, 113-186.

Fitzgerald, D. J. 2001. Cyanobacterial toxicity and human exposure. In I. Chorus, *Cyanotoxins: Occurrence, causes, consequences* (pp. 178-238). Heidelberg: Springer.

Fitzgerald, D. J., Cunliffe, D. A., & Burch, M. D. 1999. Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia. *Environmental Toxicology*, 14 (1), 203-204.

Funari, E., & Testai, E. 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 38, 97-125.

Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P. N., & Kakkar, P. 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere* (52), pp. 1-23.

Hawkins, P. R., Chandrasena, N. R., Humpage, A. R., Jones, G. J., & Falconer, I. R. 1997. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon*, 35 (3), 341-346.

Hitzfeld, B. C., Hoger, S. J., & Dietrich, D. R. 2000. Cyanobacterial Toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 108, 113-122.

Landsberg, J. H. 2002. The effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10 (2), 113-390.

Li, H., Murphy, T., Guo, J., Parr, T., & Nalewajko, C. 2008. Iron-stimulated growth and microcystin production of *Microcystis novacekii* UAM250. *Limnologia*, doi:10.1016/j.limno.2008.08.002.

Lopes, A. M., & Fonseca, Á. 1996. *Biologia Microbiana*. Lisboa: Universidade Aberta.

Mazur, H., & Plinski, M. 2003. *Nodularia Spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdansk. *Oceanologia*, 45 (2), 305-316.

Norris, R. L., Eaglesham, G. K., Pierens, G., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., et al. 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental toxicology* , 14 (1), 163-165.

Oliver, R. L., & Ganf, G. G. 2000. Freshwater Blooms. In B. A. Whitton, & M. Potts, *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space* (pp. 149-194). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Pacheco, D., Medeiros, M., Santos, M. C., Gonçalves, V., & Cruz, J. 2008. Desenvolvimentos extremos de cianobactérias na lagoa das Furnas. *Actas do 9º Congresso da Água*. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, Cascais, 2 a 4 de Abril.

Paczuska, L., & Kosakowska, A. 2003. Is iron a limiting factor of *Nodularia spumigena* blooms? *Oceanologia* , 45 (3), 679-692.

Park, H.-D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A., & kato, k. 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* , 16, 337-343.

Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araújo, F., Lagos, N., et al. 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* , 38, 1689-1702.

Piña, R. G., & Cervantes, C. 1996. Microbial interactions with aluminium. *BioMetals* , 9, 311-316.

Pitois, S., Jackson, M. H., & Wood, B. J. 2001. Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: an overview. *Journal of environmental health* , 64 (5), 25-32.

- Ramírez, P., Martínez, E., Martínez, M. D., & Eslava, C. 2004. Cianobacterias, Microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. In I. Rosas, A. Cravioto, & E. Ezcurra, *Microbiología ambiental* (pp. 83-106). México: Instituto Nacional de Ecología.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., & Stanier, R. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* , 111, 1-61.
- Rodríguez, V., Moura, S., Pinto, E., Pereira, C., & Braga, R. 2006. Aspectos toxicológicos e químicos da Anatoxina-a e seus análogos. *Química Nova* , 29 (6), 1365-1371.
- Santos, M. C., Pacheco, D., Muelle, H., Santana, F., & Cruz, J. 2008. Seasonal and Deep Variations of Microcystin Concentrations in Sete-Cidades Lake (S. Miguel Island – Azores). *7th.Iberian and 4th. Iberoamerican Congress of Environmental Contamination and Toxicology Proc., Lisbon, 10-12 de March.*
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M., Fillat, M. F., & Peleato, M. 2008. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology* , 10 (10), 2476-2483.
- Siqueira, D., & Oliveira-Filho, E. 2005. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciências da Saúde* , 3 (1), 109-127.
- Sivonen, K., & Jones, G. 1999. Cyanobacterial Toxins. In I. Chorus, & J. Bartram, *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guidance to their Public Health, Consequences, Monitoring and Management* (pp. 41-111). London: E & FN SPON.
- Svrcek, C., & Smith, D. W. 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science* , 3 (3), 155-185.

Teixeira, M. R., & Rosa, M. J. 2006. Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration. *Water Research* , 40, 2837-2846.

Tomaselli, L. 2004. The Microalgal Cell. In A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 3-19). Oxford: Blackwell Publishing.

USEPA. 2001. Creating a Cyanotoxin Target List for the Unregulated Contaminant Monitoring Rule. *United States Environmental Protection Agency Meeting, 17-18 of May*. Cincinnati, USA: USEPA - Technical Service Center.

Utkilen, H., & Gjølme, N. 1995. Iron-Stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* , 61 (2), 797-800.

Van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speljers, G. J., & Bakker, G. J. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition and food research* , 51 (1), 7-60.

Vasconcelos, V. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica* , 20 (1), 45-58.

Vasconcelos, V. 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* , 32, 249-254.

Wetzel, R., & Likens, G. 2000. *Limnological Analyses* (3rd ed.). USA: Springer-Verlag.

Whitton, B. A., & Potts, M. 2000. Introduction to the Cyanobacteria. In B. A. Whitton, & M. Potts, *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space* (pp. 1-11). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

WHO. 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. In WHO, *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1 - Coastal and fresh waters* (pp. 136-158). Geneva.

## 7 Anexo

**Tabela 7.1 - Composição do meio de cultura BG11 (Rippka *et al.*, 1979)**

Reagentes	Concentração (g/L)	Volume utilizado (ml/L)
NaNO <sub>3</sub>	150	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	40/30	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75	1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36	1
Acido cítrico combinado com citrato férrico de amónio	6	1
EDTA	1	1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	1
Solução de metais traço	Tabela 7.2	1
NH <sub>4</sub> Cl	1,1	1

**Tabela 7.2 - Composição da solução de metais traço**

Reagentes	Concentração (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,222
NaMoO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,390
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0494

